



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



---

---

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS NOVOS ANTIMALÁRICOS A  
PARTIR DE PRODUTOS NATURAIS DE PLANTAS  
AMAZÔNICAS, E SEUS DERIVADOS: ESTUDOS *IN VITRO*, *IN  
VIVO* E DE MECANISMO DE AÇÃO**

**LUIZ FRANCISCO ROCHA E SILVA**

**MANAUS - AM  
2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



---

---

**LUIZ FRANCISCO ROCHA E SILVA**

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS NOVOS ANTIMALÁRICOS A  
PARTIR DE PRODUTOS NATURAIS DE PLANTAS  
AMAZÔNICAS, E SEUS DERIVADOS: ESTUDOS *IN VITRO*, *IN  
VIVO* E DE MECANISMO DE AÇÃO**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como pré-requisito para obtenção do título de doutor em Biotecnologia, área de concentração saúde .

Orientador: Adrian Martin Pohlit

MANAUS – AM  
2014

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586i Silva, Luiz Francisco Rocha e  
Identificação de potenciais novos antimaláricos a partir de produtos naturais de plantas amazônicas, e seus derivados: estudos in vitro, in vivo e de mecanismo de ação / Luiz Francisco Rocha e Silva. 2014  
165 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Adrian Martin Pohlit  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Antimaláricos . 2. Produtos naturais. 3. Plantas amazônicas. 4. Epidemiologia da malária. 5. Malária - Prevenção. I. Pohlit, Adrian Martin II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**LUIZ FRANCISCO ROCHA E SILVA**

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS NOVOS ANTIMALÁRICOS A PARTIR DE  
PRODUTOS NATURAIS DE PLANTAS AMAZÔNICAS, E SEUS  
DERIVADOS: ESTUDOS *IN VITRO*, *IN VIVO* E DE MECANISMO DE AÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Saúde.

Aprovado em 07 de abril de 2014.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit, Presidente  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

---

Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin  
Universidade de São Paulo

---

Prof. Dr. Emerson Silva Lima  
Universidade Federal do Amazonas

---

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

---

Prof. Dr. Pedro Vitor Lemos Cravo  
Universidade Federal de Goiânia

**Aos meus pais Luiz Francisco e Elane Mara e  
Silva**

**A minha amada esposa Dijane de Souza e Silva e  
aos meus quatro filhos Daniel, Maria  
(*in memoriam*), João e Ana, três dos quais  
nascidos durante a tese.**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, Criador e Mantenedor de todas as coisas, por tudo o que Ele fez por mim durante a realização de mais este objetivo.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit, pesquisador do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), pela orientação deste trabalho bem como por todo o apoio, incentivo, paciência e disponibilidade, os quais foram fundamentais para esta realização. Obrigado por acreditar em mim!

Ao INPA e Fundação de Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) onde a maior parte deste trabalho foi realizada.

Às agências de fomento CNPq e FAPEAM pelo financiamento desta pesquisa no âmbito dos programas BIONORTE, REDEMALÁRIA, PRONEX, e o programa UNIVERSAL no qual eu pude aprovar um projeto como coordenador.

Aos amigos do INPA pelo incentivo e colaboração: Andréia Montoia, Tiago Barbosa, Zelina Torres, Renata Braga, Orivaldo Lacerda, Franciane, Karla Lagos, Ana Cristina Pinto, Rodrigo Amorim, Márcia Rúbia.

À Dra. Graça Alecrim, que me acolheu na FMT-HVD juntamente com as amigas Mônica Regina, Marly Marques, Maria José Siqueira, Yonne Chehuan e Elizângela que juntamente com toda a equipe me deram um grande apoio nas atividades de laboratório.

Aos Professores Doutores Wanderli Pedro Tadei (INPA) e Francisco Célio Cruz (EMBRAPA-AM) e instituições às quais fazem parte, pela colaboração fundamental neste trabalho.

Aos bolsistas David Siqueira, Jaqueline Siqueira, Tainá Bandeira e Suelem Michiles, pelo apoio, disponibilidade e auxílio nos estudos experimentais aqui descritos.

Ao Prof. Dr. Alejandro Miguel Katzin por ter aberto as portas do seu laboratório na USP e ter me acolhido junto com os amigos Valnice, Rodrigo, Márcia, Renata, Dani, Emília, Helô, Fabi e demais membros da equipe, na realização dos ensaios de mecanismo de ação.

À profa. Dra. Antoniana Krettli, junto com as amigas Júlia, Carol, Nicole, Isabela, Isabel e o Fábio por ter me recebido para realização de testes *in vitro* e de mecanismo de ação no CPqRR-MG.

Ao prof. Dr. Valter Andrade Neto por ter me ensinado no seu laboratório na UFRN-RN muitas das técnicas utilizadas aqui, e por ser um amigo sempre presente.

Aos Prof. Drs Idelbrando Pereira e Eliete Mesquita por ter me recebido no IPEPATRO em Rondônia, e ter me ensinado e auxiliado em vários testes.

À gerência de Ofidismo da FMT-HVD na pessoa dos amigos Dr. Luiz Lozano e Dora no apoio aos testes antimaláricos *in vivo*.

Ao Centro Universitário do Norte (UNINORTE) pelo apoio sempre presente nas horas que mais precisei.

À minha amiga Neila Picanço e família pela força dada nos momentos mais difíceis, e mesmo na última hora desta tese.

Ao Prof. Dr. Edimar Andrade, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC) da Universidade do Federal do Amazonas, e sua equipe, pela disponibilidade e colaboração.

Aos meus pais: Luiz Francisco e Elane Rocha e Silva; Irmãos: Luiz Bruno e Luany; e filhos Luiz Daniel, Maria Luiza (*in memoriam*), João Luiz e Ana Luiza pelo apoio incondicional. À eles devo a realização de mais este objetivo.

À Dijane....

Concluo escrevendo que seria impossível agradecer aqui aos muitos amigos que contribuíram diretamente comigo nestes últimos quatro anos.

*Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele, e ele o fará. **Salmos 37:5***

*O temor do Senhor é o princípio do conhecimento; os loucos desprezam a sabedoria e a instrução. **Provérbios 1:7***

*Mas, buscai primeiro o reino de Deus, e a sua justiça, e todas estas coisas vos serão acrescentadas. **Mateus 6:33***

## RESUMO

O aumento da resistência do *Plasmodium* spp. aos antimaláricos atualmente disponíveis tem impulsionado a busca de novas drogas para o tratamento da malária. A Amazônia possui uma das maiores biodiversidades do planeta com grande potencial farmacológico a ser explorado. Neste trabalho, objetivou-se identificar produtos naturais de plantas amazônicas e seus derivados com potencial antimalárico através de estudos *in vitro*, *in vivo* e de mecanismo de ação. Foram testados para atividade antimalárica *in vitro* frente a cepa K1 de *P. falciparum* 73 extratos e frações de plantas antimaláricas. As plantas que apresentaram extratos e frações mais ativos foram *Picrolemma sprucei* tendo 16 extratos e frações com  $CI_{50}$  entre 0,01 e 3,7  $\mu\text{g/mL}$ , *Aspidosperma vargasii* com 5 extratos e frações ( $CI_{50}$  0,14-4,38  $\mu\text{g/mL}$ ) e *A. desmanthum* com 4 frações ( $CI_{50}$  0,18-0,20  $\mu\text{g/mL}$ ). As demais plantas em sua maioria apresentaram extratos inativos ou parcialmente ativos. 27 substâncias foram testadas para atividade antimalárica *in vitro*: os alcalóides indólicos elipticina (**9**) ( $CI_{50}$  0,35  $\mu\text{M}$ ) e olivacina (**10**) ( $CI_{50}$  1,2  $\mu\text{M}$ ), 5 alcalóides de *A. ulei* ( $CI_{50}$  16,7 a > 100  $\mu\text{M}$ ), o alcaloide sintético criptolepina (**11a**,  $CI_{50}$  0,8  $\mu\text{M}$ ) e seu análogo sintético (**11b**,  $CI_{50}$  0,08  $\mu\text{M}$ ), derivados semi-sintéticos de **9** ( $CI_{50}$  0,55-17  $\mu\text{M}$ ), 4 limonoides naturais ( $CI_{50}$  7,0-20,7  $\mu\text{M}$ ) e um limonóide semi-sintético 6 $\alpha$ -hydroxy-deacetylgedunin ( $CI_{50}$  5,0  $\mu\text{M}$ ), 4-nerolidilcatecol (**1**) ( $CI_{50}$  0,68  $\mu\text{M}$ ) e seus derivados *O*-monobenzilado (**4**,  $CI_{50}$  7,05  $\mu\text{M}$ ), *O,O*-dibenzoilado (**5**,  $CI_{50}$  28,73  $\mu\text{M}$ ) e *O,O*-diacetilado (**12**,  $CI_{50}$  4,85  $\mu\text{M}$ ). Destas substâncias, 9 foram direcionadas para avaliação da atividade antimalárica *in vivo* em camundongos infectados com *P. berghei* (teste supressivo de 4 dias de Peters). **1** apresentou baixa atividade antimalárica *in vivo* com a inibição máxima da parasitemia de 63% na dose 600 mg/kg/dia via oral. Os derivados **5** e **12** foram mais ativos que o produto natural **1**, sendo **12** o que apresentou melhor atividade com 62% de inibição da parasitemia na dose de 200 mg/kg/dia. Os limonóides 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (**23**) e 7-deacetoxi-7-oxogedunina (**24**) apresentaram inibição máxima *in vivo* de 65,7 e 40,3%, respectivamente, em dose oral de 100 mg/kg/dia. Os alcalóides **9** e **10** apresentaram ótima atividade antimalárica *in vivo* com inibição da parasitemia de 100 e 97% respectivamente na dose oral de 50 mg/kg/dia, e foram as substâncias mais ativas neste ensaio. Os alcalóides **9-11a** e os derivados **4** e **12** foram avaliados quanto ao seu potencial de inibição da formação de hemozoína, e todas estas as substâncias atuaram inibindo a polimerização do heme, sendo **4** o que apresentou menor atividade. Inibição de hemozoína é um dos mecanismos de ação antimaláricos propostos para estas substâncias. **12** e **4** foram estudados quanto ao seu efeito sobre a via de biossíntese de isoprenóides em *P. falciparum* *in vitro* através de marcação metabólica com [1-(*n*)-<sup>3</sup>H]geranilgeranilpirofosfato. **4** e **12** apresentaram um importante efeito inibitório sobre a biossíntese de dolicol 12 (45 e 42%, respectivamente), e **12** também apresentou efeito inibitório sobre a biossíntese de ubiquinona 8 (36%) e menquinona 4 (41%). Os dados indicam que derivados de **1** exercem forte efeito sobre a via de biossíntese de isoprenóides em *P. falciparum*. É possível concluir que os alcalóides indólicos elipticina e olivacina e derivados de 4-nerolidilcatecol apresentaram potencial para estudos continuados pelo seu potencial antimalárico demonstrado no presente trabalho.

**Palavras-chave:** novos antimaláricos, produtos naturais, Amazônia, *in vitro*, *in vivo* mecanismo de ação.

## ABSTRACT

Increasing resistance of *Plasmodium* spp. to the currently available antimalarials has led to the search of new drugs for the treatment of malaria. The Amazon region has one of the greatest biodiversities on the planet with large pharmacological potential for exploration. In this work, the aim was to identify natural products from traditionally used antimalarial plants from the Amazon and derivatives having antimalarial potential through *in vitro*, *in vivo* and mechanism studies. 73 extracts and fractions of antimalarial plants were tested for *in vitro* antimalarial activity against *P. falciparum* K1 strain. The most active were the 16 extracts and fractions of *Picrolemma sprucei* (IC<sub>50</sub> 0.01-3.7 µg/mL), 5 extracts and fractions of *Aspidosperma vargasii* (IC<sub>50</sub> 0.14-4.38 µg/mL) and 4 fractions of *A. desmanthum* (IC<sub>50</sub> 0.18-0.20 µg/mL). The remaining plants in general exhibited inactive or partially active extracts. 27 substances were tested for *in vitro* antimalarial activity: indole alkaloids ellipticine (**9**) (IC<sub>50</sub> 0.35 µM) and olivacine (**10**) (IC<sub>50</sub> 0.35 µM), 5 alkaloids from *A. ulei* (IC<sub>50</sub> 16.7 to > 100 µM), the synthetic indole alkaloid cryptolepine triflate (**11a**, IC<sub>50</sub> 0.8 µM) and a synthetic analog of cryptolepine (**11b**, IC<sub>50</sub> 0.08 µM), semi-synthetic derivatives of **9** (IC<sub>50</sub> 0.55-17 µM), 4 limonoids (IC<sub>50</sub> 7.0-20.7 µM) and a semi-synthetic limonoid 6α-hydroxy-deacetylgedunin (IC<sub>50</sub> 5.0 µM), 4-nerolidylcatechol (**1**) (IC<sub>50</sub> 0.68 µM) and its *O*-monobenzyl (**4**, IC<sub>50</sub> 7.05 µM), *O,O*-dibenzoyl (**5**, IC<sub>50</sub> 28.73 µM) and *O,O*-diacetyl (**12**, IC<sub>50</sub> 4.85 µM) derivatives. 9 substances were evaluated for possible *in vivo* antimalarial activity in mice infected with *P. berghei*. **1** exhibited low *in vivo* antimalarial activity with maximal inhibition of parasitemia of 63% at an oral dose of 600 mg/kg/day. Derivatives **5** and **12** were more active than the natural product **1** and **12** exhibited the highest suppression of parasitemia (62%) at a dose of 200 mg/kg/day. The limonoids 6α-acetoxygedunin (**23**) and 7-deacetoxy-7-oxogedunin (**24**) exhibited maximal *in vivo* inhibitions of 65.7 and 40.3%, respectively, at oral doses of 100 mg/kg/day. Alkaloids **9** and **10** exhibit excellent *in vivo* antimalarial activity evidenced by 100 and 97% suppressions of parasitemia, respectively, at oral doses of 50 mg/kg/day and were the most active substances in this assay. 5 substances were selected for studies on the antimalarial mechanism of action. The alkaloids **9-11a** and derivatives **4** and **12** were evaluated for potential inhibition of the formation of hemozoin. These substances all inhibited the polymerization of heme. **4** exhibited the lowest activity. Inhibition of the formation of hemozoin is one of the mechanisms of antimalarial action proposed for these substances. The effects of **12** and **4** on the isoprenoid biosynthetic pathway in *P. falciparum* *in vitro* were also studied using incorporation of radiolabeled metabolite geranylgeranylpyrophosphate. **4** and **12** exhibited an important inhibitory effect on the biosynthesis of dolichol **12** (45 and 42%, respectively), and **12** also exhibited inhibitory effects on the biosynthesis of ubiquinone 8 (36%) and menaquinone 4 (41%). It is possible to conclude that the indole alkaloids ellipticine and olivacine and derivatives of 4-nerolidylcatechol exhibited potential for continued studies based on the antimalarial potential demonstrated in the present work.

**Keywords:** new antimalarial drugs, natural products, Amazon, *in vitro*, *in vivo* mechanism of action.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estratégias para a descoberta e desenvolvimento de novas drogas antimaláricas .....	4
Figura 2	Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> sp.....	14
Figura 3	Estruturas dos produtos naturais quinina e artemisinina e seus análogos sintéticos e derivados semi-sintéticos.....	27
Figura 4	Estruturas do 4-nerolidilcatecol (1) e seus derivados semi-sintéticos 2-8.....	34
Figura 5	Estrutura dos alcaloides indólicos elipticina (9), olivacina (10), triflato de criptolepina (11a), derivado de criptolepina 11b.....	35
Figura 6	Esquema da reação de síntese do derivado O,O-diacetil-4-nerolidilcatecol (12) a partir de 4-nerolidilcatecol (1).....	41
Figura 7	Substâncias majoritárias presentes nos óleos essenciais de plantas nordestinas: $\alpha$ -bisobolol (13; <i>V. arbórea</i> ), estragol (14; <i>L. sidoides</i> ) e timol (15; <i>C. zehntneri</i> ).....	58
Figura 8	Estrutura dos alcalóides indólicos isolados de <i>A. ulei</i> : 20-epidasicarpidona (16), Ác. 12-hidroxi-N-acetil-21(N)-desidroplumerano-18-óico (17), 19E-hunteracina (18), 20(E)-16,17-nor-subincanadina E (19) e 3,4,5,6-tetradesidro- $\beta$ -ioimbina (20).....	64
Figura 9	Limonóides isolados de <i>C. guianensis</i> : 6 $\alpha$ -acetoxiazadiradiona (22), andirobina (22), 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (23) e 7-deacetil-7-oxogedunina (24) e o derivado semi-sintético 6 $\alpha$ -hidroxideacetilgedunina (24) e gedunina (26).....	65
Figura 10	Estrutura da curcumina (21) e endoperóxidos sintéticos 22-30.....	66
Figura 11	Estrutura molecular da Hemozoina proposta por Egan .....	100
Figura 12	Via MEP para biossíntese de isopentenil-pirofosfato (IPP) e dimetilalil-pirofosfato (DMPP).....	103
Figura 13	Diagrama representando a biossíntese de produtos finais da via de isoprenóides em <i>P. falciparum</i> .....	104
Figura 14	Inibição da formação de hemozoína pela cloroquina(A), triflato de criptolepina (B), elipticina (C), olivacina (D), 1,2-O,O-diacetil 4-nerolidilcatecol (E) e 2-O-benzil 4-nerolidilcatecol (F).....	113
Figura 15	Níveis radioativos das frações contendo dolicois 11 e 12 do extrato hexânico obtido de culturas no estágio esquizonte tratadas e não-	

tratadas por 48 h com 4,0 $\mu$ M de 1,2-O,O-diacetil 4-nerolidilcatecol (12) e 2-O-benzil 4-nerolidilcatecol (4) após purificação por HPLC .....	118
Figura 16 Níveis radioativos das frações contendo ubiquinona 8 e menaquinona-4 do extrato hexânico obtido de culturas no estágio esquizonte tratadas e não-tratadas por 48 horas com 4,0 $\mu$ M de 1,2-O,O-diacetil 4-nerolidilcatecol (12) e 2-O-benzil 4-nerolidilcatecol (4) após purificação no por HPLC .....	119
Figura 17 Imagem em papel fotográfico de gel de SDS-PAGE de proteínas obtidos de culturas de <i>P. falciparum</i> no estágio anel, trofozoíta e esquizonte tratadas e não-tratadas por 36 h com 4,0 $\mu$ M dos derivados de 4-nerolidilcatecol e marcadas com [1- <sup>14</sup> C] AcONa.....	120
Figura 18 Estrura dos terpenos limoneno (28), linalol (29), nerolidol (30), farnesol (31) e ácido S-farnesiltiosalicílico (32) testados em Rrodrigues-Goulart et al. (2004), com as CI <sub>50</sub> frente a cepa 3D7 de <i>P. falciparum</i> do lado direito, em compração com 4-nerolidilcatecol (1) e seus derivados semissintéticos 2-7 testados em Pinto et al. (2009) com as CI <sub>50</sub> frente a cepa K1 de <i>P. fallciparum</i> .....	122

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Data de introdução e primeiros casos registrados da resistência do <i>P. falciparum</i> aos antimaláricos mais utilizados.....	18
Tabela 2	Principais plantas amazônicas investigadas para atividade antimalárica pelo grupo de pesquisas em Manaus e resultados relevantes.....	30
Tabela 3	Atividade antimalárica <i>in vitro</i> de extratos e frações obtidos de espécies vegetais da flora amazônica frente a cepa K1 de <i>P. falciparum</i> . ....	52
Tabela 4	Atividade antimalárica <i>in vitro</i> de extratos e frações das cascas de oito espécies de <i>Aspidosperma</i> da Amazônia frente à cepa W2 de <i>P. falciparum</i> .....	56
Tabela 5	Atividade antimalárica <i>in vitro</i> de óleos essenciais (OE) e compostos majoritários dos OE frente à cepa K1 de <i>P. falciparum</i> .....	59
Tabela 6:	Concentração inibitória 50% (CI <sub>50</sub> ) de substâncias naturais presentes em plantas amazônicas e seus derivados semi-sintéticos frente às cepa K1 e 3D7 de <i>P. falciparum</i> . ....	61
Tabela 7:	Atividade antimalárica <i>in vitro</i> de endoperóxidos e tetraoxanos sintéticos frente à cepa K1 de <i>P. falciparum</i> .....	67
Tabela 8:	Média das concentrações inibitórias 50% (CI <sub>50</sub> ) de nove isolados de campo de <i>P. vivax</i> frente á drogas padrão e produtos naturais.....	68
Tabela 9:	Diferenças entre as espécies de <i>Plasmodium berghei</i> , <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> utilizadas no estudo de novas drogas.....	74
Tabela 10:	Supressão <i>in vivo</i> do <i>Plasmodium berghei</i> em camundongos infectados e sobrevida após tratamento oral e subcutâneo com alcalóides indólicos.....	83
Tabela 11:	Supressão <i>in vivo</i> do <i>Plasmodium berghei</i> em camundongos infectados e sobrevida após tratamento oral e subcutâneo com limonóides.....	85
Tabela 12:	Supressão <i>in vivo</i> do crescimento de <i>Plasmodium berghei</i> em	

camundongos apos tratamento oral e subcutâneo com 4-nerolidilcatecol (4NC).....	87
Tabela 13: Efeito do plasma de camundongos que ingeriram 4-nerolidilcatecol sobre formas sanguíneas de <i>P. falciparum in vitro</i> .....	90
Tabela 14: Supressão <i>in vivo</i> do crescimento de <i>Plasmodium berghei</i> em camundongos apos tratamento oral e subcutâneo com O,O-diacetil 4-nerolidilcatecol (4NC-Ac2) e 1,2-O,O-dibenzoil 4-nerolidilcatecol (4NC-Bz).....	92

**LISTA DE ABREVEATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS**

Ac<sub>2</sub>O - anidrido acético  
BSA - Albumina sérica bovina  
°C - Grau Célsios  
CC – cromatografia em coluna  
CDC – Center for Disease Control (EUA)  
CHCl<sub>3</sub>– clorofórmio  
C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>COCl – cloreto de benzoíla  
C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>Cl – cloreto de benzila  
C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N – piridina  
Ci -Curie (1 Ci = 3,7 × 10<sup>10</sup> desintegrações/segundo)  
Cl<sub>50</sub> - concentração que inibe o crescimento de 50% dos parasitas  
CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono  
CPqRR - Centro de Pesquisas René Rachou  
DMSO - dimetilsulfóxido  
DP - Desvio padrão  
DS – derivado semi-sintético  
EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético  
ELISA – ensaio imuno enzimático  
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
EtOH - etanol  
FMT-HVD - Fundação de Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado  
FPP - Farnesil pirofosfato  
g – grama  
g - aceleração da gravidade (9,8 m/s<sup>2</sup>)  
GGPP -feranilgeranil pirofosfato  
GPP - geranil pirofosfato  
h - hora  
HEPES - ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N-2-etanossulfônico  
HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência (high performance liquid chromatography)  
Hex - hexano  
INPA - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia  
i-PrOH – isopropanol  
IPP - Isopentenil pirofosfato  
IPEPATRO – Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais de Rondônia  
LAPAAM – Laboratório de Princípios ativos da Amazônia  
L – Litro  
LABMAT - Laboratório de Biologia da Malária e Toxoplasmose  
Log - Logaritmo base 10  
Me – metila  
MeOH – metanol  
Min – minuto  
mg – miligrama  
mL – mililitro  
m/m – massa/massa  
N° – número  
n- BuOH – 1- butanol

4-NC – 4-nerolidilcatecol

ng – Nanograma

nM – Nanomolar

n-OctOH – 1-octanol

n-PrOH – 1-propanol

NT – não testado

O<sub>2</sub> – Oxigênio

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

pLDH – lactato desidrogenase do parasito

PN – produto natural

RMN – ressonância magnética nuclear

rpm - rotações por minuto

RPMI 1640 - Roswell Park Memorial Institute (Meio de cultivo)

TRIS - Tris (hidroximetil) aminometano

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

v/v - volume/ volume

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µM – Micromolar

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	1
OBJETIVOS .....	10
GERAL.....	10
ESPECÍFICOS.....	10
Capítulo 1 - ATIVIDADE ANTIMALÁRICA <i>IN VITRO</i> DE PRODUTOS NATURAIS, SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS E SEMI-SINTÉTICAS.....	11
1. 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
1. 1.1 Malária: aspectos gerais .....	12
1.1.2 Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> .....	13
1.1.3 Epidemiologia da malária.....	16
1.1.3.1 Malária no mundo .....	16
1.1.3.2 Malária no Brasil .....	16
1. 1.4 Resistência aos antimaláricos disponíveis.....	17
1.1.5 Estudo de novas drogas para o tratamento da malária .....	20
1.1.5.1 Estudo <i>in vitro</i> de atividade antiplasmódica.....	22
1.1.5.2 Estudo <i>in vitro</i> com <i>Plasmodium vivax</i> .....	24
1.1.6 Plantas como fonte de drogas antimaláricas .....	26
1.1.7 Plantas Amazônicas e suas substâncias: fontes de potenciais novas drogas para malária .....	28
1.1.7.1 4-nerolidilcatecol e seus derivados .....	33
1.1.7.2 Elipticina e alcalóides indólicos análogos .....	34
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
1.2.1 Material vegetal e substâncias químicas .....	37
1.2.1.1 Obtenção dos extratos e frações de <i>Minuartia</i> e <i>Geissospermum</i> .....	38
1.2.1.2 Obtenção dos extratos e frações de <i>Tachia grandiflora</i> .....	38
1.2.1.3 Obtenção dos extratos de <i>Cassia spruceana</i> .....	38
1.2.1.4 Obtenção dos extratos e frações de <i>Picrolemma sprucei</i> , e da neosergeolida .....	38
1.2.1.5 Obtenção dos extratos e frações de <i>Aspidosperma</i> spp. ....	39

1.2.1.6 Obtenção dos óleos essenciais de espécies vegetais do nordeste brasileiro e seus compostos majoritários .....	39
1.2.1.7 Obtenção dos alcalóides indólicos.....	40
1.2.1.8 Obtenção dos limonóides de <i>Carapa guianenses</i> .....	40
1.2.1.9 Isolamento de 4-nerolidilcatecol (1) e obtenção dos derivados .....	41
1.2.1.10 Endoperóxidos sintéticos .....	42
1.2.2 Cultivo <i>in vitro</i> do <i>P. falciparum</i> .....	42
1.2.3 Microteste de susceptibilidade <i>in vitro</i> .....	44
1.2.3.1 Método por análise microscópica.....	44
1.2.3.2 Teste pelo método da incorporação da [ <sup>3</sup> H]-hipoxantina .....	45
1.2.4 Teste <i>in vitro</i> com isolados de campo de <i>P. vivax</i> .....	45
1.2.4.1 Aspectos éticos .....	46
1.2.4.2 Amostras de <i>P. vivax</i> .....	46
1.2.4.3 Microteste <i>in vitro</i> com <i>P. vivax</i> .....	46
1.2.5 Tratamento estatístico.....	48
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
1.3.1 Atividade antimalárica <i>in vitro</i> de extratos vegetais e frações .....	50
1.3.1.1 Extratos e frações vegetais de plantas amazônicas .....	51
1.3.1.2 Extratos e frações de <i>Aspidosperma sp</i> .....	55
1.3.1.3 Óleos Essenciais de plantas nordestinas e seus compostos majoritários .....	57
1.3.2 Atividade antimalárica <i>in vitro</i> de substâncias naturais e seus análogos sintéticos e semi-sintéticos .....	60
1.3.3 Endoperóxidos sintéticos .....	66
1.3.4 Susceptibilidade de isolados de campo de <i>P. vivax</i> a produtos naturais. 67	
1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS DO CAPÍTULO.....	71
 Capítulo 2 - ATIVIDADE ANTIMALÁRICA <i>IN VIVO</i> DE PRODUTOS NATURAIS E SEUS DERIVADOS SEMI-SINTÉTICOS EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>P. berghei</i> .....	72
2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	73
2.1.1 Estudo da atividade antimalárica <i>in vivo</i> .....	73
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	77
2.2.1 Substâncias químicas estudadas.....	77
2.2.2 Animais de experimentação e aspectos éticos .....	78

2.2.3 Teste de atividade antimalárica <i>in vivo</i> no modelo murino .....	78
2.2.4 Atividade <i>in vitro</i> frente o <i>P. falciparum</i> do plasma inativado de camundongos que receberam 4-nerolidilcatecol via oral.....	79
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	81
2.3.1 Atividade antimalárica <i>in vivo</i> de alcalóides indólicos.....	82
2.3.2 Atividade antimalárica <i>in vivo</i> de limonóides.....	85
2.3.3 Atividade antimalárica <i>in vivo</i> de 4-Nerolidilcatecol e derivados.....	86
2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS DO CAPÍTULO.....	95
Capítulo 3 - ESTUDOS SOBRE OS MECANISMOS DE AÇÃO ANTIMALÁRICO DE ALCALÓIDES INDÓLICOS E DERIVADOS DE 4-NEROLIDILCATECOL. ....	96
3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	97
3.1.1 Alvos terapêuticos e estudo do mecanismo de ação de drogas antimaláricas.....	97
3.1.2 Polimerização do heme e formação de hemozoína.....	99
3.1.3 Via de biossíntese de isoprenóides em <i>P. falciparum</i> .....	101
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	106
3.2.1 Substâncias químicas .....	106
3.2.2 Teste de inibição de formação de hemozoína .....	106
3.2.3 Avaliação do efeito de derivados de 4-nerolidilcatecol sobre a via de biossíntese de isoprenóides em <i>P. falciparum in vitro</i> .....	107
3.2.3.1 Tratamento de culturas de <i>P. falciparum</i> com derivados de 4-nerolidilcatecol e marcação metabólica com radioisótopo para análise de isoprenóides:.....	108
3.2.3.2 Análise e purificação por <i>RP-HPLC</i> dos intermediários da biossíntese de isoprenóides em <i>P. falciparum</i> .....	108
3.2.3.3 Tratamento de culturas de <i>P. falciparum</i> com derivados de 1 e marcação metabólica para análise da inibição da síntese de proteínas .....	110
3.2.3.4 Gel de eletroforese em poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	110
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	111
3.3.1 Inibição da formação de hemozoína pelos alcalóides indólicos e derivados de 4NC .....	111
3.3.2 Efeito dos derivados de 4-nerolidilcatecol sobre a via de biossíntese de isoprenóides e biossíntese de proteínas em <i>P. falciparum</i> .....	116

3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS DO CAPÍTULO.....	123
4 CONCLUSÃO .....	125
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126
Anexos .....	143
Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido .....	144
Anexo 2 – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) .....	145
Anexo 3 – Parecer consubstanciado sobre protocolo de pesquisas no uso de animais.....	146

# Introdução

---

## INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, que acomete milhões de pessoas nas zonas tropicais e subtropicais do globo. Apesar dos grandes investimentos de recursos e avanços científicos para malária na área molecular, celular e clínica, vacinas clinicamente efetivas ainda estão distantes de serem utilizadas como ferramentas disponíveis para o controle e erradicação, sendo a quimioterapia a principal ferramenta para o controle da doença (AGUIAR et al. 2012).

Passados mais de uma década do início do século o número de casos de malária e mortes em decorrência da doença ainda assustam, e grandes desafios precisam ser superados para se alcançar a meta global para malária até 2015 estabelecida pela Organização das Nações Unidas que é diminuir e deter a incidência da doença. Em 2012, foram estimados 207 milhões de casos em todo o mundo, com um total de mais de 627.000 mortes. No Brasil, 242.748 casos de malária foram registrados em 2012, estimando-se que 15% sejam atribuídos ao *Plasmodium falciparum* e 85% ao *P. vivax*. A região amazônica concentra 99,9% dos casos do país, sendo considerada uma das mais importantes áreas endêmicas do mundo (WHO 2013).

O controle da malária tem se tornado cada vez mais complexo dada a dispersão de cepas multi-resistentes de *Plasmodium spp.*. Nos últimos anos a resistência do *P. falciparum* aos derivados da artemisinina tem sido detectada em quatro países da Grande Sub-região *Mekong* no sudeste asiático: Camboja, Mianmar, Tailândia e Vietnã (WHO 2013). Para o *P. vivax*, a espécie mais importante fora do continente africano, incluindo as Américas, o registro de resistência *in vivo* e *in vitro* à cloroquina tem sido cada vez mais documentada (CHEHUAN et al. 2013; SANTANA FILHO et al. 2007; MARQUES et al. 2013). Diante desta realidade, novas entidades químicas que possam superar os mecanismos de resistência e oferecer significantes avanços sobre os regimes de tratamento existentes, são uma urgente demanda.

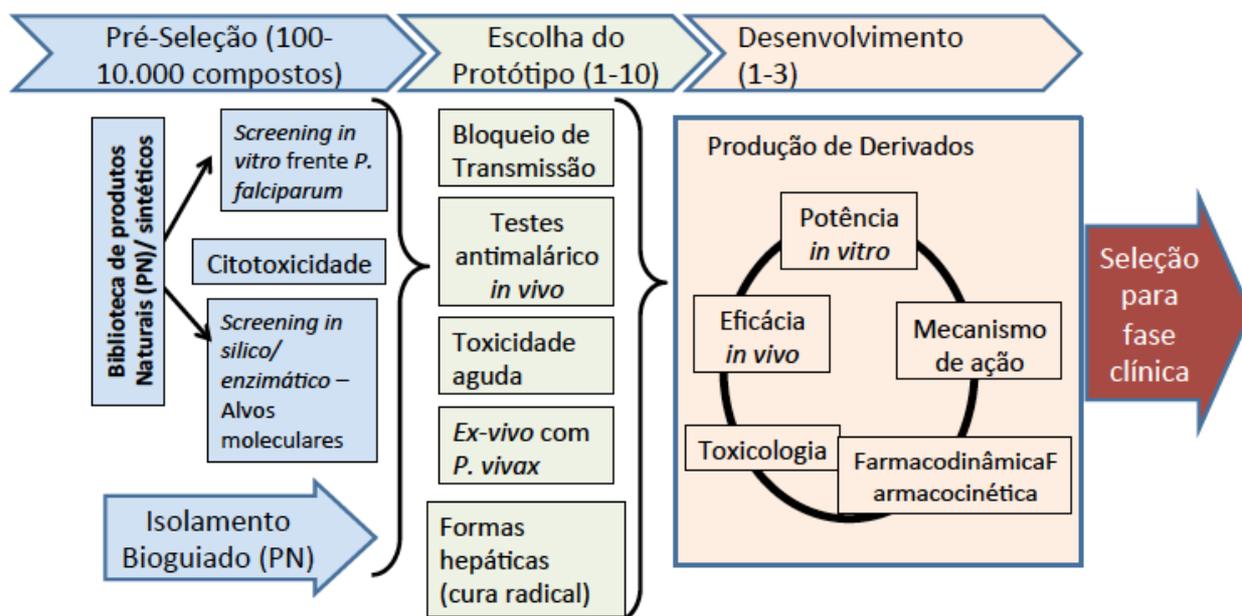
Os produtos naturais e seus derivados são fontes importantes na busca de fármacos, e ainda representam mais de 30% dos produtos farmacêuticos

introduzidos no mercado nos últimos 30 anos (NEWMAN e CRAGG 2012). Sabe-se que os produtos naturais possuem alta diversidade estrutural, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares que fazem deles substâncias favoráveis como compostos líderes para o desenvolvimento de novos fármacos. A Amazônia é um dos maiores biomas do planeta onde o uso de plantas medicinais por populações tradicionais para o tratamento de diversas doenças é uma prática corrente. Sendo uma das principais áreas endêmicas de malária do mundo e, com um arsenal de substâncias ainda não explorada na sua biodiversidade, existe um apelo social e científico para identificação de possíveis novos fármacos antimaláricos de plantas da região amazônica (POHLIT et al. 2013).

A busca da nova geração de antimaláricos requer o uso de estratégias inovadoras aliadas a conceitos clássicos de descoberta e desenvolvimento de drogas (figura 1). Novos antimaláricos podem ser descobertos inicialmente por triagens (*screening*) de produtos naturais e/ou de bibliotecas de substâncias sintéticas. A história nos mostra que a busca de antimaláricos com base em produtos naturais tem sido bem sucedida. A estratégia principal no isolamento de novas substâncias líderes a partir da biodiversidade, consiste no isolamento guiado por bioatividade na qual ensaios biológicos e farmacológicos são utilizados para dirigir o isolamento de substâncias bioativas (BURROWS et al. 2013; KAUR et al. 2009).

Uma das estratégias utilizadas para triagem inicial na busca de novos antimaláricos é o *screening in vitro* com o *P. falciparum*. Quando se utiliza este modelo, a inibição do parasito é monitorada pela mensuração do crescimento e proliferação, frequentemente sem conhecer o alvo molecular da ação da substância. Outra abordagem comum é a utilização de ensaios que detectem inibidores de alvos específicos do parasito. Após a confirmação da atividade biológica no parasito, prossegue-se com testes de citotoxicidade com preferência a células saudáveis. Esta primeira etapa pode ser realizada com um grande número de amostras (100-10.000 compostos ou extratos) e está relacionada à avaliação e pré-seleção de uma substância de estrutura molecular protótipo (JIMENEZ-DIAZ et al. 2013).

Após esta primeira triagem, prossegue-se com a introdução do modelo animal para testes de atividade antimalárica *in vivo* utilizando espécies de *Plasmodium* de roedor, avaliação da toxicidade *in vivo*, e testes mais específicos de bloqueio de transmissão e cura radical envolvendo formas hepáticas do parasito. No modelo murino, efeitos associados ao hospedeiro como a imunidade e efeitos associados à droga como absorção, metabolismo, distribuição e excreção, também podem ser avaliados (KRETTLI et al. 2009; NOGUEIRA e ROSÁRIO 2010). O recente desenvolvimento de ensaios *ex vivo* utilizando *P. vivax*, coloca este teste como um importante parâmetro a ser avaliado, porém isso só é possível em áreas endêmicas, dada a necessidade de se utilizar isolados de campo (DRUILHE et al. 2007).



**Figura 1. Estratégias para a descoberta e desenvolvimento de novas drogas antimaláricas. Adaptado (ADITYA et al. 2013; FLANNERY et al. 2013; JIMENEZ-DIAZ et al. 2013)**

A preparação de derivados e análogos químicos a partir da substância selecionada como protótipo visando otimizar a atividade e a farmacologia, bem como a caracterização do mecanismo de ação, são etapas que constituem o processo de desenvolvimento. Através destas atividades é possível selecionar com maior segurança um grupo de substâncias análogas e/ou derivadas do

protótipo para as etapas pré-clínicas ao desenvolvimento de um possível antimalárico. Embora o processo de descoberta e desenvolvimento de novos antimaláricos não se dê de forma tão linear, a figura 1 apresenta um esquema convencionado por alguns autores.

Nos últimos anos o grupo de pesquisa do Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM) no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), tem estudado quimicamente plantas de diversas famílias, tais como Apocynaceae, Simaroubaceae, Piperaceae, Gentianaceae e outras, com indicação popular para tratamento da malária. Muitos destes estudos químicos, conduziram ao isolamento e caracterização de diversas substâncias, algumas das quais tiveram suas atividades antimaláricas *in vitro* publicadas pelo nosso grupo de pesquisa como 4-nerolidilcatecol (ANDRADE-NETO et al. 2007), os alcalóides indólicos elipticina e aspidocarpina (ANDRADE-NETO et al. 2007; HENRIQUE et al. 2010), e os quassinóides isobruceína-B e neosergeolida (ANDRADE-NETO et al. 2007; SILVA et al. 2009), todas consideradas ativas com concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) menores que 1µM. Também, integrantes do LAPAAM elaboraram a semi-síntese de derivados de 4-nerolidilcatecol com maior estabilidade e atividade antiplasmódica *in vitro* comparável ao 4-nerolidilcatecol (PINTO et al. 2009; PINTO et al. 2009), alguns derivados semissintéticos da elipticina com atividade antiplasmódica *in vitro* comparável à da elipticina (MONTOIA 2013) e alguns derivados da neosergeolida e isobruceína B com reduzida atividade antiplasmódica *in vitro* (SILVA et al. 2009).

Diante da urgente necessidade da descoberta e desenvolvimento de novas drogas para malária imposta pelo aumento da resistência do *Plasmodium* spp. aos antimaláricos tradicionais e do grande potencial antiplasmódico das substâncias estudadas pelo nosso grupo de pesquisa, no presente trabalho foi ampliado o número de extratos, frações e substâncias testadas *in vitro* para malária com a finalidade de priorizarmos substâncias para as fases seguintes. Desta forma prosseguimos com a exploração deste potencial através de estudos *in vivo* e de mecanismos de ação, buscando descobrir e desenvolver possíveis novos antimaláricos a partir de produtos naturais.

Esta abordagem segue o paradigma histórico da descoberta dos antimaláricos atualmente utilizados na clínica, pois a quinina e a artemisinina foram descobertas e isoladas respectivamente das cascas de *Chinchona sp* (América do Sul) e das folhas de *Artemisia annuana* (China), utilizadas tradicionalmente para o tratamento da doença em suas regiões de origem. A estrutura química básica da quinina foi utilizado para conceber o desenvolvimento de todas as aminoquinolinas sintéticas: cloroquina, primaquina, mefloquina, tafenoquina e outras (VALE et al. 2005). A partir da artemisinina isolada de *A. annua* são preparados os derivados semi-sintéticos artesunato e arteméter, que em combinação com outros antimaláricos são as drogas de primeira escolha para o tratamento da malária causada pelo *P. falciparum* e são a alternativa para tratar cepas multi-resistentes de *P. vivax* (CRUZ et al. 2013). Dada a importância da síntese e semi-síntese no desenvolvimento dos antimaláricos atuais, aqui foram investigadas para atividade antimalárica substâncias naturais, semi-sintéticas (produzidas a partir de produtos naturais) e algumas substâncias sintéticas cujas estruturas químicas foram inspiradas nas de produtos naturais.

Seguindo a lógica do paradigma de que os antimaláricos atuais devem suas origens a plantas utilizadas tradicionalmente no tratamento da malária, realizamos uma triagem inicial dos extratos frações e substâncias oriundas de plantas antimaláricas frente ao *P. falciparum in vitro*. Buscou-se também caracterizar a atividade antimalárica *in vitro* de algumas substâncias frente ao *P. vivax* que é responsável por mais de 80 % dos casos de malária na região Amazônica (OLIVEIRA-FERREIRA et al. 2010). Uma vez que a cultura contínua de *P. vivax* ainda não foi estabelecida, esta estratégia inovadora e inédita de se testar produtos naturais frente o *P. vivax in vitro* foi baseada em trabalhos recentes com métodos para testes *in vitro* com cultura limitada de *P. vivax* para estudos de resistência em isolados de campo, os quais tem sido bem aplicados na região amazônica (CHEHUAN et al. 2013; DRUILHE et al. 2007). Vale ressaltar que testes *in vitro* com *P. vivax* só podem ser realizados em regiões endêmicas como a Amazônia (onde o atual trabalho foi realizado), pois requerem obrigatoriamente uso de isolados de campo recém colhidos de pacientes infectados com esta espécie parasitária.

Após um extenso estudo *in vitro* de extratos vegetais, frações e substâncias naturais, semi-sintéticas e sintéticas, foi selecionado um grupo de substâncias para testes de atividade antimalárica *in vivo* em camundongos infectados com *P. berghei*. O modelo de estudo antimalárico *in vivo* utilizado aqui foi o teste de supressão de 4 dias estabelecido por Peters (1965) que tem sido amplamente adotado nos programas de descoberta e desenvolvimento de drogas antimaláricas nos últimos 50 anos, incluindo os antimaláricos atualmente utilizados na clínica (AGUIAR et al. 2012; FLANNERY et al. 2013; JIMENEZ-DIAZ et al. 2013; KRETTLI et al. 2009; NOGUEIRA e ROSÁRIO 2010).

Finalmente duas classes de substâncias foram selecionadas para estudos aprofundados de mecanismo de ação em alvos moleculares específicos prioritários do *Plasmodium* spp.. Alcalóides indólicos e derivados de 4-nerolidilcatecol foram investigados quanto a sua capacidade de inibição de formação de hemozoína. Os derivados de 4-nerolidilcatecol também foram avaliados quanto ao seu efeito inibitório na via de biossíntese de isoprenóides em *P. falciparum*. A escolha dos alvos farmacológicos para o estudo dos possíveis mecanismos de ação das substâncias priorizadas foi baseado no entendimento da relação entre a estrutura molecular da substância e os possíveis alvos no parasito.

Esta tese foi estruturada em três capítulos temáticos de acordo com os objetivos propostos. O primeiro capítulo inicia com uma revisão bibliográfica dos aspectos gerais da malária e é dedicado ao estudo de atividade antimalárica *in vitro* frente ao *P. falciparum* e testes preliminares *in vitro* com cultura limitada de isolados de campo de *P. vivax* realizados com os compostos mais promissores. No segundo capítulo são apresentados estudos farmacológicos *in vivo* onde foi avaliada a eficácia terapêutica dos principais compostos sobre o modelo da malária. O capítulo três trata dos estudos de mecanismo de ação antiplasmodial das substâncias mais promissoras em alvos moleculares específicos do parasito.

Desta forma, este trabalho vem apresentar alguns caminhos para a descoberta de novos antimaláricos e contribuir diretamente para a

caracterização mais profunda da atividade antimalárica e elucidação do mecanismo de ação de substâncias amazônicas, com vista a futuros estudos pré-clínicos e clínicos e o melhor aproveitamento da biodiversidade da região.

# Objetivos

---

## OBJETIVOS

### GERAL

Identificar novos antimaláricos a partir de produtos naturais de plantas amazônicas, seus derivados semi-sintéticos e substâncias sintéticas através de estudos *in vitro*, *in vivo* e de mecanismo de ação.

### ESPECÍFICOS

- Descobrir extratos, frações, substâncias naturais, semi-sintéticas e sintéticas com atividade antimalárica *in vitro* contra o *P. falciparum*.
- Caracterizar a susceptibilidade *in vitro* de isolados de campo de *P. vivax* frente a substâncias que foram ativas *in vitro* contra o *P. falciparum*.
- Avaliar atividade antimalárica *in vivo* de limonóides, alcalóides indólicos e derivados de 4-nerolidilcatecol em camundongos infectados com *P. berghei*.
- Investigar o efeito inibitório de alcalóides indólicos e derivados de 4-nerolidilcatecol sobre a formação de hemozoína *in vitro*.
- Investigar o efeito de derivados de 4-nerolidilcatecol sobre a via de biossíntese de isoprenóides em *P. falciparum*;

# Capítulo 1

---

**ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* DE PRODUTOS  
NATURAIS, SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS E SEMI-SINTÉTICAS**

## 1. 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. 1.1 Malária: aspectos gerais

A malária ou paludismo é uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crônica, com manifestações episódicas de caráter agudo, que acomete milhões de pessoas nas zonas tropicais e subtropicais do globo. Os parasitos da malária pertencem ao gênero *Plasmodium*, da família Plasmodiidae, filo Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucocciida. Das 150 espécies de *Plasmodium* descritas, as que prioritariamente parasitam o homem são: *P. malariae*, *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. knowlksi* e o mais recente descrito para infecção humana *P. cynomolgi* (TA et al. 2014). Estudos atuais de filogenética descreveram duas variantes de *P. ovale*: *Plasmodium ovale curtisi* e *Plasmodium ovale wallikeri* (SUTHERLAND et al. 2010). Outras espécies de *Plasmodium* descritas na literatura (*P. yoelii*, *P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. cynomolgi*) têm como hospedeiros mamíferos selvagens (GIRARD et al. 2007). A espécie de *Plasmodium* mais amplamente disseminada em todo o mundo é o *P. vivax*. Esta espécie se encontra em quase todas as regiões onde a malária é endêmica. O *Plasmodium falciparum* causa a forma mais grave da doença, sendo o principal responsável pelas causas de óbito (MARKELL et al. 2003).

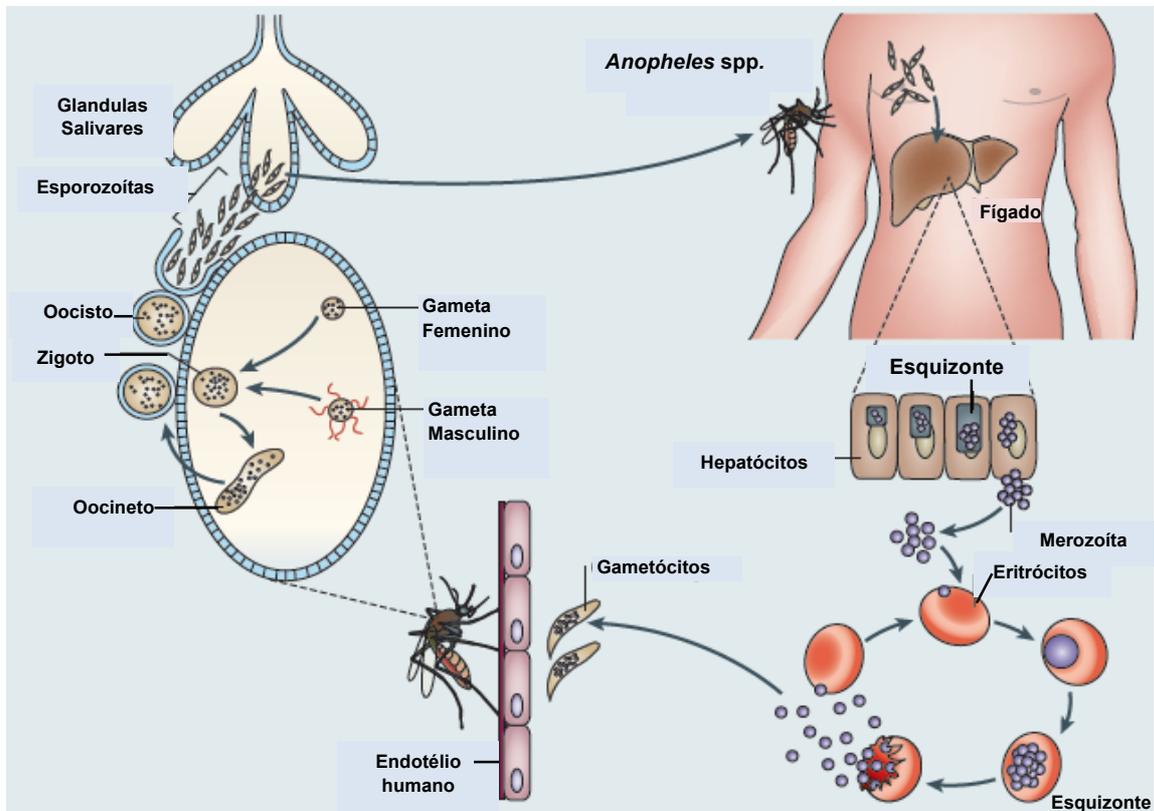
A transmissão do *Plasmodium* ao homem ocorre por meio da picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* no momento do repasto sanguíneo, essa última precisa de sangue para a maturação dos ovos. Este gênero compreende cerca de 400 espécies, das quais apenas reduzido número tem importância para a epidemiologia da malária em cada região. De acordo com o trabalho desenvolvido por Tadei e Dutari-Tatcher (2000), que tinha o objetivo de determinar a importância da transmissão da malária, várias espécies de *Anopheles* foram estudadas e das 33 espécies de ocorrência na Amazônia, apenas oito foram encontradas infectadas por *Plasmodium*, sendo o *Anopheles darlingi*, o principal vetor na região.

Os primeiros sintomas da malária são inespecíficos, e semelhantes aos da maioria das doenças virais. As manifestações clínicas variam de acordo com a espécie de plasmódio e o estado imunológico do hospedeiro. Em geral, os sintomas envolvem dor de cabeça, dores musculares, náuseas e tonturas, seguidos de uma sensação de frio, acompanhada de tremor, febre, suor e um aumento da temperatura. Nos casos complicados podem ocorrer dores abdominais fortes, sonolência e redução da consciência e até coma, como na malária cerebral. Não é comum ocorrer malária severa causada por *P. vivax*, *P. malarie* ou *P. ovale*, mas infecções agudas em um hospedeiro não-imune podem ser preocupantes (FERREIRA 2005). Fatores relacionados diretamente ao plasmódio como: resistência às drogas, variação e polimorfismo antigênicos, capacidade de rosetamento e citoaderência associados a fatores do próprio homem como imunidade, produção de citocinas inflamatórias, aspectos genéticos, idade e gravidez, também são importantes e responsáveis pelas diferentes respostas clínicas à infecção (WEATHERALL et al. 2002).

### **1.1.2 Ciclo biológico do *Plasmodium***

Todas as espécies de *Plasmodium* tem um complexo ciclo de vida que envolve interações celulares e moleculares com o hospedeiro invertebrado (*Anopheles*) nas fases sexuadas e um hospedeiro vertebrado no ciclo assexuado (figura 2) (FLANNERY et al. 2013). O ciclo assexuado ou esquizogônico inicia-se quando os esporozoítas, formas infectantes contidas na saliva do mosquito, são inoculados no homem durante o repasto sanguíneo. Uma vez injetados na pele, os esporozoítas usam sua mobilidade ativa para alcançar os capilares sanguíneos e terminam sua jornada no fígado, período que pode levar cerca de 30 a 60 min. Nem todos os esporozoítas inoculados deixam a pele, isto depende da espécie de parasito e do grau de vascularização no sítio de inoculação. Outros eventos que ocorrem durante a jornada do esporozoíta, tais como a passagem através das barreiras endoteliais da pele e do fígado precisam ser esclarecidas, assim como é

controversa a interação entre estas formas do parasito com as células de Kupffer (fagócitos do fígado) (MARKELL et al. 2003; MENARD et al. 2008).



**Figura 2. Ciclo biológico do *Plasmodium* sp. (FLANNERY et al. 2013)**

Os esporozoítas penetram as células do hospedeiro formando um vacúolo parasitófago com a membrana do hepatócito. A composição molecular desta junção é pouco conhecida, com apenas algumas proteínas identificadas. Duas proteases utilizadas pelo parasito na invasão estão muito bem caracterizadas: a proteína do circunsporozoítio (CS) e a proteína de superfície do esporozoítio 2 (SSP2), também conhecida como TRAP (MENARD et al. 2008).

Dentro dos hepatócitos, os esporozoítas sofrem sucessivas divisões mitóticas dando origem ao esquizonte hepático, com milhares de merozoítas em seu interior (VALE et al, 2005). Os merozoítas deixam os hepatócitos e vão infectar os eritrócitos na corrente sanguínea, onde tem início uma nova fase de

reprodução assexuada (VALE et al. 2005). Nas infecções causadas por *P. falciparum* e *P. malariae*, os esquizontes se rompem todos ao mesmo tempo e não persistem no interior dos hepatócitos. Já no *P. ovale* e no *P. vivax*, algumas formas exoeritrocíticas, denominadas hipnozoítas permanecem latentes no fígado por meses ou anos, e estas formas parecem ser responsáveis pelas recidivas tardias da doença (FERREIRA 2005).

Após a penetração nos eritrócitos, os merozoítos transformam-se em trofozoítas jovens na forma de anel e se desenvolvem. Em determinado momento, ocorrem divisões do núcleo, dando origem ao esquizonte sanguíneo que origina um número variável de merozoítos. Os eritrócitos se rompem liberando os merozoítos, que invadem outros eritrócitos, reiniciando o ciclo eritrocítico. Depois de alguns ciclos um pequeno número de merozoítos diferenciam-se em gametócitos femininos (macrogametócitos) e masculinos (microgametócitos), que permanecem na membrana dos eritrócitos até serem ingeridos pelos mosquitos dando início ao ciclo sexuado ou esporogônico (VALE et al. 2005).

A transformação dos gametócitos em gametas, ocorre no interior do intestino do mosquito logo após a ingestão do sangue. A formação do gameta macho (microgameta) é propiciada por fatores como queda da temperatura e modificação do pH. O microgametócito sofre um processo chamado de exflagelação, originando os microgametas, flagelados e móveis, que fecundarão o macrogameta desenvolvido. A fertilização dos gametas gera um zigoto e posteriormente uma forma invasiva, o oocineto, que pode movimentar-se em direção ao epitélio estomacal do mosquito, atravessando-o e permanecendo entre o mesmo e a lâmina basal, em uma forma vegetativa, chamado de oocisto. Este cresce e sofre divisões (esporogonia) produzindo de 2 a 8000 esporozoítos. Estes esporozoítos rompem a parede do oocisto e migram para as glândulas salivares do *Anopheles* através da hemolinfa, tornando-se a forma infectante para o homem (WEATHERALL et al. 2002). A grande complexidade do ciclo de vida do parasito explica as enormes dificuldades que tem vindo a ser experimentadas, ao longo dos tempos para o estabelecimento de uma terapia antimalárica eficaz e segura.

### **1.1.3 Epidemiologia da malária**

#### **1.1.3.1 Malária no mundo**

A malária está amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do planeta e é considerada uma das doenças parasitárias mais importantes. A Organização Mundial de Saúde estima que 40 % da população mundial, isto é, 3,3 bilhões de pessoas vivem em áreas com alto risco de transmissão da malária em 106 países onde a doença é considerada endêmica (WHO 2011). O número de casos no mundo foi estimado em 226 milhões em 2000 com um aumento para 244 milhões em 2005 reduzindo para 207 milhões em 2012. Em 2012, a doença causou 627.000 mortes, sendo 85 % destas, crianças africanas com idade inferior a cinco anos. Embora o número de casos e óbitos da doença tenha reduzido 17 % desde o ano 2000, esta redução está muito aquém da meta global para malária até 2015 estabelecida pela Organização das Nações Unidas (WHO 2013).

Nas Américas a transmissão da malária ocorre em 21 países com 20% da população vivendo em área de risco. O *P. falciparum* é responsável por menos de 30% dos casos do continente. O número de casos confirmados de malária notificados na região diminuiu de 1,1 milhões em 2000 para 469.000 em 2012. Três países foram responsáveis por 76% dos casos nas Américas em 2012: Brasil (52%), Colômbia (13%) e Venezuela(1%).

#### **1.1.3.2 Malária no Brasil**

Aproximadamente 99,9% dos casos de malária no Brasil ocorrem na Amazônia Legal que é composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Maranhão, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. No Brasil, a doença continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública, com 306.000 casos registrados em 2009, mas é estimado que nos anos 1940s o número de casos chegou a ser estimado em seis milhões a cada ano. Desde

de 2000, mais de 75% dos casos de malária do Brasil são atribuídos ao *P. vivax*, e o restante dos casos ao *P. falciparum* (OLIVEIRA-FERREIRA et al. 2010). Nos últimos anos o número de casos vem decaindo com 234.509 casos em 2012 e uma estimativa de menos de 200.000 casos em 2013 (SIVEP-MALÁRIA, 2014).

### **1.1.3.2 Malária no Amazonas**

A implementação de medidas de controle como a descentralização do diagnóstico e tratamento, e a intensificação das ações de controle vetorial, tem contribuído para a redução do número de casos no Estado do Amazonas, embora este ainda seja alto. Em 2012 foram registrados 82.973 casos versus 75.903 em 2013, uma redução de 9% dos casos (SIVEP-MALÁRIA 2014).

Os estados do Amazonas, Pará e Rondônia concentram 77 % dos casos do Brasil. Nos últimos anos, Manaus e Porto Velho apresentam extensas áreas de aglomerados urbanos em regiões periféricas, indicadas como rurais. Essas áreas têm se configurado importantes locais de infecção por receberem intenso fluxo de pessoas que se deslocam de outros municípios em busca de oportunidades de trabalho ou necessidades comerciais. Assim, esses municípios concentraram 26,9% e 22,9% dos casos de malária da região Amazônica nos anos de 2007 e 2008 respectivamente (OLIVEIRA-FERREIRA et al. 2010).

### **1. 1.4 Resistência aos antimaláricos disponíveis**

A resistência do *P. falciparum* às drogas antimaláricas emergiu como um dos maiores desafios a ser enfrentado para o controle da malária. Esse fenômeno implica no aumento de mortalidade nas áreas hiper e holoendêmicas e contribuiu para o aparecimento e ampliação de novos focos de malária causada pelo *P. falciparum*. Acima de tudo, a resistência adquirida às drogas antimaláricas foi identificada como um fator de contingenciamento econômico do controle da malária (TRAPE et al. 2002).

Diferentes mecanismos podem modificar o padrão de sensibilidade de vários organismos às drogas. No caso particular do *Plasmodium falciparum*, o aparecimento da resistência é atribuído em primeiro lugar à ocorrência de mutações gênicas espontâneas e em segundo lugar à pressão seletiva desenvolvida pelos medicamentos sobre as populações de parasitos sensíveis e parasitos resistentes, independente da dose utilizada (MACKINNON 2005).

No Brasil, no início da década de 60, foram descritos os primeiros casos de resistência à cloroquina, em pacientes com malária causada pelo *P. falciparum* procedentes da região Amazônica e do Nordeste (SILVA 1961). Na década de 80, Alecrim (1981), em estudos *in vitro* e *in vivo* sobre a resistência às drogas antimaláricas na Amazônia, demonstrou 100% de resistência *in vitro* do *P. falciparum* à cloroquina. A tabela 1 relata os primeiros registros da resistência no mundo a diversos antimaláricos.

**Tabela 1: Data de introdução e primeiros casos registrados da resistência do *P. falciparum* aos antimaláricos mais utilizados.**

Fármaco	Introduzido em	Primeiro registro de resistência	Diferença (anos)
Quinino	1632	1910	278
Cloroquina	1945	1957	12
Proguanil	1948	1949	1
Sulfadoxina- Pirimetamina	1967	1967	0
Mefloquina	1977	1982	5
Artemisinina e derivados	1980	2008	27

Fonte: (CRAVO e ROSÁRIO 2003; EKLAND e FIDOCK 2008)

O *P. falciparum* continua apresentando diminuição da sensibilidade às drogas habitualmente usadas, constituindo sério problema para o controle e erradicação da malária. Atualmente todos os países com áreas malarígenas

apresentam cepas resistentes de *P. falciparum* tanto à cloroquina como aos demais antimaláricos. Além disso, também há registros da diminuição da sensibilidade do *P. vivax* a estas drogas. Outro fenômeno preocupante é a identificação de fenótipos de parasitos resistentes a duas ou mais drogas simultaneamente, fato conhecido como *multidrug resistance (MDR)*, ou resistência múltipla a drogas, e é bem caracterizado no sudoeste asiático, América do Sul e África (GUERIN et al. 2002).

A cloroquina é a droga de primeira escolha para o tratamento para malária causada pelo *P. vivax*, segundo os protocolos estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (WHO 2013). A emergência da resistência do *P. vivax* à cloroquina tem sido muito bem documentada ao redor do mundo incluindo no Brasil (GAMA et al. 2011). Achados clínicos na região da Amazônia Brasileira tem demonstrado altos graus de recrudescência em pacientes com malária causada por *P. vivax* tratados com cloroquina (SANTANA FILHO et al. 2007). Recentemente estudos *in vitro* e de dosagens séricas da droga tem reforçado os achados anteriores, confirmando o fenômeno de resistência do *P. vivax* à cloroquina na região amazônica (CHEHUAN et al. 2013; MARQUES et al. 2013).

A artemisinina e seus derivados semi-sintéticos são as drogas mais efetivas disponíveis para o tratamento de pacientes portadores de cepas multi-resistentes de *P. falciparum*. Nos últimos anos, a resistência do *P. falciparum* aos derivados da artemisinina tem sido detectada em quatro países da Grande Sub-região Mekong no sudeste asiático: Camboja, Mianmar, Tailândia e Vietnam (WHO 2013).

Estudos de sensibilidade *in vitro* à artemisinina com isolados de campo de *P. falciparum* da China têm demonstrado concentrações inibitórias 50% ( $CI_{50}$ ) em 1999 até 3,3 vezes maior que em 1988, indicando diminuição da sensibilidade dos parasitos neste país. Isolados de campo do Camboja, Guiana Francesa e Senegal apontaram uma elevação significativa dos valores de  $CI_{50}$  à artemisinina (JAMBOU et al. 2005). O mesmo foi observado em outro estudo realizado com amostras das Ilhas de São Tomé e Príncipe, onde detectou-se em algumas amostras valores de  $CI_{50}$  até 15 vezes maiores que a média para

artemisinina e artemeter (FERREIRA et al. 2007). Dois genes que originalmente demonstraram modular a sensibilidade do *P. falciparum* à cloroquina têm sido investigados no contexto da artemisinina: *pfmdr1* e *pfcr1*. Porém, os dados clínicos não confirmam a correlação entre mutações ou número de cópias destes genes e a resistência do parasito *in vivo*. Embora controversa, muitos pesquisadores continuam explorando a idéia de que uma *ATPase*  $Ca^{++}$  dependente do retículo sarcoendoplasmático do parasito seja um importante alvo da artemisinina, e mutações no gene *pfatp6* que codifica a enzima tem sido estudadas (BRASIL et al. 2012; KRISHNA et al. 2014). A possibilidade da emergência da resistência aos derivados de artemisinina, que representa a última classe de droga que temos em mãos para tratar cepas de *Plasmodium* multirresistente, aumenta a necessidade de busca de novas drogas para o tratamento da doença.

### **1.1.5 Estudo de novas drogas para o tratamento da malária**

Novas drogas com estruturas e mecanismos de ação singulares são urgentemente necessárias para se tratar cepas de *Plasmodium* multirresistentes. O objetivo global para o controle da malária está em expandir o arsenal de drogas com uma nova geração de moléculas que agem em vários estágios do ciclo de vida do parasito: nas formas sanguíneas assexuadas que são as formas responsáveis pela patogenia da doença, nas quais todos os antimaláricos atuais agem; nos gametócitos responsáveis pela transmissão; e nas formas hepáticas, incluindo hipnozoítas que causam as recaídas do *P. vivax* (AGUIAR et al. 2012).

No desenvolvimento de novos tratamentos para malária, um número de critérios-chave precisa ser cumprido por novos candidatos à droga: alta potência, baixo custo, alta estabilidade em condições tropicais, bom potencial de desenvolvimento, baixas chances de desenvolvimento de resistência e altos níveis de segurança em populações vulneráveis como mulheres grávidas e crianças menores de 5 anos (BURROWS et al. 2013).

Conforme apresentado acima, a biologia dos parasitos causadores da malária é complexa. Envolve um ciclo de vida no qual o parasito se apresenta em diferentes formas e fases com expressões protéicas e metabólicas diferentes em cada uma das fases. Dessa forma, são necessários diferentes tipos de abordagens para que se possa obter fármacos eficazes contra a doença.

Diversas estratégias estão disponíveis para a descoberta de novas drogas antimaláricas. Estas podem ser descobertas através de triagens (*screening*) de biblioteca de compostos sintéticos e/ou de produtos naturais, contra o parasito inteiro ou alvos moleculares específicos. Quando se utiliza o parasito inteiro a inibição é monitorada pela mensuração do crescimento e proliferação, sem conhecer o alvo molecular do composto testado. Esta foi a estratégia que identificou todos os antimaláricos utilizados na clínica. A outra abordagem comumente utilizada para triagens de drogas envolve ensaios que detectem inibidores de alvos moleculares específicos do parasito, porém nenhuma classe de antimaláricos foi descoberta nos últimos vinte anos através desta abordagem. Estes estudos requerem a validação da atividade frente ao próprio parasito (FLANNERY et al. 2013). Resultados *in vitro*, devem ser confirmados no modelo animal em testes de atividade antimalárica *in vivo*. Neste capítulo focaremos nos estudos *in vitro*, sendo o modelo *in vivo*, objeto de estudo do próximo capítulo.

A busca de novos antimaláricos a partir de produtos naturais envolve esforços científicos coordenados de diversos profissionais. Estes profissionais geralmente representam distintas áreas da academia, notadamente a botânica, química de produtos naturais e sintética, farmacologia, bioquímica, parasitologia e biologia molecular (ANDRADE-NETO et al. 2007).

A estratégia principal para obtenção de novas substâncias líderes consiste no isolamento guiado por bioatividade na qual ensaios biológicos ou farmacológicos são utilizados para identificar extratos e suas frações ativas e dirigir os estudos químicos. Sabe-se que os produtos naturais possuem alta diversidade estrutural, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares que os fazem favoráveis como compostos líderes para a

descoberta de novos fármacos. Essa diversidade e especificidade podem diferenciá-los das bibliotecas de componentes sintéticos e combinatoriais, sobretudo no que diz respeito aos seus mecanismos de ação (KAUR et al. 2009).

#### **1.1.5.1 Estudo *in vitro* de atividade antiplasmódica.**

Em 1976 o cultivo contínuo *in vitro* do parasito causador da malária humana, *P. falciparum*, foi descrito pela primeira vez, e isto preparou o caminho para o desenvolvimento de diversas técnicas para investigar o efeito de drogas na sobrevivência e crescimento de formas sanguíneas assexuadas do parasito. Estas técnicas têm sido utilizadas para estudos de monitoramento da resistência e desenvolvimento de drogas (TRAGER e JENSEN 1976). Os testes *in vitro* são basicamente isentos de riscos para o paciente, não são invasivos (com exceção da coleta de sangue para amostra) e são essenciais para o desenvolvimento de drogas (NOGUEIRA e ROSARIO 2010).

Tradicionalmente, os testes *in vitro* de susceptibilidade do plasmódio a drogas são todos baseados na medida do efeito das substâncias no crescimento e desenvolvimento dos parasitos. Tal efeito permite observar o grau de inibição do crescimento e/ou morte parasitária, refletindo o grau de susceptibilidade do parasito a um determinado fármaco a uma determinada concentração. Esta abordagem permite um descarte quase total de fatores interferentes relacionados ao hospedeiro, tais como sua imunidade e seu metabolismo relacionado ao composto, deste modo, fornecendo uma avaliação direta do impacto da droga sobre o parasito (CHAIJAROENKUL et al. 2005).

Rieckmann et al. (1968) desenvolveram o primeiro ensaio laboratorial descrito capaz de medir a capacidade do parasito de se desenvolver da fase de anel jovem para esquizonte, usando as mudanças morfológicas para o monitoramento dos antimaláricos, conhecido como macroteste. Dez anos depois, vislumbrado em determinar áreas cloroquino-resistentes, Rieckmann et al. (1978) simplificaram o procedimento em microcultura para medir a inibição

de maturação dos esquizontes em 24 h, que passou a ser conhecida como microtécnica.

Desde então, o microteste tem sido a principal ferramenta dos estudos de campo da Organização Mundial da Saúde para o monitoramento da resistência *in vitro* do *P. falciparum* e triagem para novas drogas, sobretudo em países subdesenvolvidos que não possuem recursos para a implementação de técnicas mais dispendiosas. A grande dificuldade na microtécnica que utiliza a análise microscópica está não somente em quantificar os eritrócitos parasitados, mas também identificar em qual estágio do ciclo de vida o parasito se encontra o que consome bastante tempo e requer microscopistas treinados. Isso limita a triagem de um grande número de compostos (DIAZ et al. 2009). O aprimoramento do microteste teve por objetivo tornar sua execução mais prática e de baixo custo, e permanece até o presente como uma das técnicas mais simples para avaliação de sensibilidade e triagem de novas drogas *in vitro* (ANDRADE-NETO et al. 2007).

Desjardins et al. (1979) desenvolveram um ensaio para o estudo da susceptibilidade do *P. falciparum* com o emprego de material radioativo baseado na inibição da incorporação da hipoxantina tritiada pelo parasito para demonstrar o efeito das substâncias testadas. Este método tem alto grau de reprodutibilidade, além ser possível testar uma grande quantidade de substâncias em menos tempo por ser consideravelmente mais rápido na sua execução do que o teste baseado na avaliação microscópica. Porém esta técnica apresenta limitações para ser executada em campo, por necessitar de equipamentos específicos, envolve a manipulação de materiais radioativos, e apresenta muitas etapas no protocolo de execução (SANCHEZ et al. 2007).

Nos últimos anos diversas técnicas para mensuração do crescimento do parasito têm sido desenvolvidas como alternativas à microscopia e ao teste radioativo. A quantificação de enzimas específicas do parasito e que são indicadores de crescimento celular tem sido empregada através de técnicas baseadas em ELISA-sanduiche. A pLDH (lactato desidrogenase do parasito) e a proteína rica em histidina (HRP2) tem sido os antígenos parasitários mais utilizados. Métodos fluorimétricos utilizando corantes que intercalam ácidos

nucleicos (SYBR Green, YOYO-1 e outros), métodos que utilizam parasitos recombinantes transfectados com proteína fluorescente (GFP) também tem sido empregados. Esses métodos garantem sensibilidade semelhantes ao método radioisotópico de [<sup>3</sup>H]-hipoxantina (KRETTLI et al. 2009; POHLIT et al. 2013).

É importante notar que técnicas *in vitro* baseadas em culturas de *P. falciparum* não fornecem informações do potencial metabolismo *in vivo* de substâncias que podem ser requeridas como um passo de ativação de pró-drogas. Da mesma forma dados farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos não são fornecidos por testes *in vitro*. Compostos que exibem promissora atividade antimalárica *in vitro* necessitam ser testados em modelos animais *in vivo* com espécie de *Plasmodium* de roedor conforme será discutido no próximo capítulo.

#### **1.1.5.2 Estudo *in vitro* com *Plasmodium vivax***

A malária causada pelo *P. vivax* é considerada uma doença negligenciada para a qual poucos estudos de susceptibilidade à droga tem sido realizados, resultando em poucos esforços de pesquisa e desenvolvimento de novas drogas anti-*P. vivax*. O dogma que classifica a doença como malária benigna, é um dos motivos que leva à falta de pesquisas na área, embora haja diversos estudos relatando a gravidade da malária causada por *P. vivax*. Outro motivo é a falta de estabelecimento de um sistema de cultivo contínuo *in vitro* para o *P. vivax* (FLANNERY et al. 2013; POHLIT et al. 2013).

O cultivo contínuo do *P. vivax* prevê várias dificuldades, principalmente pelo fato de que o parasito invade seletivamente reticulócitos (hemácias jovens) que representam apenas cerca de 2% do sangue circulante. Diversas pesquisas têm sido desenvolvidas na tentativa de se estabelecer o cultivo contínuo do *P. vivax*, o que traria grandes avanços para o conhecimento da biologia do parasito assim como aconteceu com o *P. falciparum*, porém o cultivo contínuo do *P. vivax* parece uma realidade distante (UDOMSANGPETCH et al. 2007). A emergência da resistência do *P. vivax* à cloroquina e o fato de que este parasito apresenta perfil genético e de

sensibilidade diferente do *P. falciparum* tem impulsionado pesquisas com o objetivo de desenvolver ensaios que possam mensurar a sensibilidade *in vitro* do *P. vivax* às drogas tradicionalmente utilizadas e em perspectiva de se identificar novas drogas que comprovadamente ajam nesta espécie de *Plasmodium* (CARLTON et al. 2011; GAMA et al. 2011).

Tasanor et al (2002) desenvolveram um método de cultura limitada de *P. vivax* objetivando um ensaio capaz de se mensurar a sensibilidade do parasito à cloroquina. Foram utilizados isolados de campo de *P. vivax* da Tailândia, inicialmente na fase de trofozoita jovem (anel) os quais maturaram até as formas maduras de esquizonte. O principal diferencial da técnica foi a utilização do meio de cultura Waymouth. A avaliação da parasitemia foi realizada por microscopia. O objetivo do ensaio foi alcançado, e 200 isolados de *P. vivax* tiveram sua sensibilidade à cloroquina avaliada, com resposta satisfatória a droga.

O *double-site enzyme linked LDH immunodetection test (DELI-Test)* estabelecido para o *P. falciparum* tem sido adaptado para estudos com *P. vivax*. O ensaio consiste na detecção da enzima lactato desidrogenase de *Plasmodium* (pLDH) por meio de imunoensaio após o período de incubação do parasito com a droga. A técnica tem sido adaptada em laboratórios de áreas endêmicas para se monitorar a emergência da resistência do *P. vivax* a cloroquina (DRUILHE et al. 2007).

Recentemente, Chehuan et al. (2013) utilizaram a técnica do DELI-test para avaliar a susceptibilidade *in vitro* de 112 isolados de campo de *P. vivax* da região amazônica à cloroquina e à mefloquina. O DELI-teste foi utilizado para detectar o crescimento do *P. vivax* na presença das drogas em cultura limitada de 48 h, com determinação posterior das  $CI_{50}$  traçando um perfil de sensibilidade dos isolados de campo da região à cloroquina e à mefloquina. A resistência *in vitro* estimada no estudo foi muito semelhante à observada na clínica, sugerindo que o DELI-test realizado por laboratórios capacitados pode ser ferramenta valiosa para estudos de resistência *in vitro* à cloroquina na região Amazônica.

Todos os testes desenvolvidos até aqui com *P. vivax* tem o objetivo de se avaliar a sensibilidade do parasito às drogas tradicionais. O grande desafio é adaptar estes ensaios para se triar novas drogas, sobretudo a partir de produtos naturais.

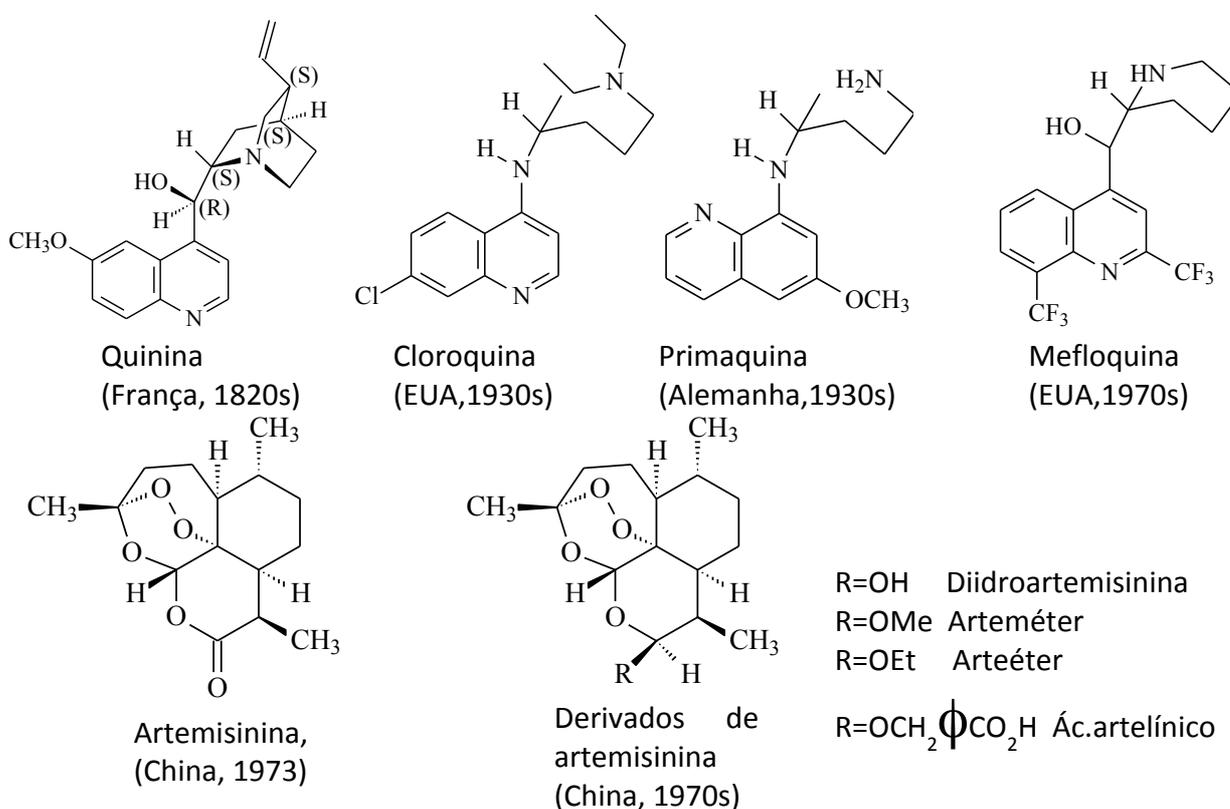
### 1.1.6 Plantas como fonte de drogas antimaláricas

Os fármacos antimaláricos utilizados atualmente são baseados em produtos naturais ou compostos sintéticos produzidos a partir da década de 40. As principais drogas que fazem parte dos esquemas terapêuticos utilizados no mundo foram produzidas a partir de protótipos químicos isolados de plantas (FRANÇA et al. 2008).

Antes da chegada dos europeus ao continente americano os índios peruanos usavam a casca da quina (árvores do gênero *Cinchona*) para o tratamento da malária. Em 1677, a casca da quina foi incluída na Farmacopeia de Londres sob a designação Cortex peruano, sendo este o primeiro registro oficial na Europa, sobre quimioterapia antimalárica. Ao longo da Europa continental era comum a utilização da “casca de jesuíta”, como era conhecida a casca da quina, para tratar malária. Em 1820, os químicos franceses Pelletier e Caventou isolaram a substância ativa da casca da quina, o alcalóide quinina (figura 3), trabalho que foi reconhecido e premiado pelo Instituto Francês de Ciências. Partindo do entendimento da estrutura básica da quinina que somente foi elucidada na primeira metade do século XX, foram sintetizadas algumas das principais drogas utilizadas no tratamento da malária como a cloroquina, primaquina, mefloquina, entre outras drogas quinolínicas (figura 3) (VALE et al. 2005).

Os esquemas terapêuticos de primeira escolha para o tratamento da malária causada pelo *P. falciparum*, sobretudo para cepas multi-resistentes, está baseado na terapia combinada com os derivados de artemisinina (*artemisinin-based combination therapy*-ACT). (Figura 3) (CRUZ et al. 2013). Na década de 70, a artemisinina foi isolada das folhas de *Artemisia annua* (Asteraceae), uma planta originária do norte da China, onde é conhecida popularmente como “qinghao” (erva verde)(HSU 2006).

Esta erva é utilizada pela medicina tradicional chinesa a mais de 2000 anos na forma de infusão para o tratamento de febre e malária. A atual Farmacopeia da China descreve as folhas secas da planta como um remédio para febre, incluindo malária. Dentre os metabólitos presentes na planta, a artemisinina foi considerada o componente ativo principal. Seu teor pode variar consideravelmente dependendo da parte da planta, condições de crescimento e variações sazonais e geográficas (MUELLER et al. 2000; MUELLER et al. 2004).



**Figura 3. Estruturas dos produtos naturais quinina e artemisinina e seus análogos sintéticos e derivados semi-sintéticos.**

A artemisinina é pouco ativa *in vivo* em função de sua baixa solubilidade, absorção e propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas. Para resolver este problema, vários derivados artemisinínicos semi-sintéticos foram

desenvolvidos, dos quais os principais são o artesunate, solúvel em água, e o artemeter, solúvel em óleo (RIDDER et al. 2008). Na figura 3 observamos a estrutura química da artemisinina e dos seus principais derivados. Apesar de sua eficácia, o tratamento com os artemisinínicos isolados produz altas taxas de recrudescência, sendo desaconselhada a monoterapia. Uma forma de potencializar a ação do fármaco reside na sua combinação com outros antimaláricos, como a mefloquina, a lumefantrina e os antifolatos (WHO 2010).

A atovaquona, uma naftoquinona que é altamente ativa *in vitro* contra as formas sanguíneas de *P. falciparum* e no modelo animal, resulta em baixas taxas de cura na malária humana e seleciona parasitos mutantes com redução da susceptibilidade à droga. Porém quando combinado com hidrocloreto de proguanil, a atovaquona é recomendada pela Organização Mundial de Saúde para o tratamento de malária não complicada em viajantes retornando de países não endêmicos. A droga clinicamente validada age nos gametócitos e também nas formas sanguíneas assexuadas. Teve sua estrutura concebida a partir da otimização do lapachol, uma naftoquinona isolada pela primeira vez da planta *Tabebuia avellanedae* em 1982. A atovaquona foi utilizada para tratamento de febre e malária no século 19 na América do Sul (AGUIAR et al. 2012; WELLS 2011). Estas evidências nos levam a refletir sobre a importância e a necessidade de se estudar plantas medicinais utilizadas tradicionalmente no tratamento da malária como fontes de novos antimaláricos.

### **1.1.7 Plantas Amazônicas e suas substâncias: fontes de potenciais novas drogas para malária**

A Amazônia é única no mundo e possui a maior biodiversidade do planeta tendo um vasto e complexo ecossistema com uma área aproximada de 5,5 milhões de km<sup>2</sup>, dos quais 60 % estão em território brasileiro e o restante distribuído em mais oito países na América do Sul. Com uma flora e fauna riquíssima, seu conhecimento representa um dos maiores desafios para o desenvolvimento do Brasil (ANDRADE-NETO et al. 2007; BASSO et al. 2005). Frequentemente novas espécies são adicionadas à lista da diversidade que

conta com 40.000 espécies de plantas, 427 mamíferos, 1.294 pássaros, 378 répteis, 427 anfíbios e 3.000 peixes que já foram cientificamente classificados na região (CALDERON et al. 2009).

Sendo uma das áreas endêmicas da malária de grande importância no planeta, a convivência forçada de populações tradicionais com a malária levou, ao longo do tempo, à busca por alternativas no ambiente amazônico, de recursos terapêuticos que minimizassem seus efeitos e permitissem ao habitante da região desenvolver suas atividades. A formação cultural da Amazônia e o ambiente rico em espécies vegetais favorecem a experimentação das plantas nativas para o tratamento da malária (BRANDAO et al. 1992; CALDERON et al. 2009; CARVALHO et al. 1991).

Baseado no conceito de que a nova geração de antimaláricos pode ser descoberta a partir de plantas utilizadas na medicina tradicional, nos últimos anos o grupo de pesquisa LAPAAM no INPA em Manaus, tem estudado diversas plantas popularmente tidas como antimaláricas. Foram realizados diversos estudos químicos com a preparação de extratos, frações, isolamento e elucidação estrutural de substâncias que também serviram de matéria-prima para preparação de derivados semi-sintéticos. Na tabela 2 a seguir, são incluídos os principais resultados alcançados nos últimos anos com estudos sobre a química de plantas antimaláricas da região Amazônica por este grupo de pesquisas.

No período em que muitos destes estudos químicos foram realizados, o teste antimalárico *in vitro* não estava disponível para auxiliar no isolamento de substâncias ativas, sendo a maioria dos estudos guiados por dados da literatura e resultados de técnicas cromatográficas. A partir deste banco de amostras do LAPAAM foi desenvolvida a primeira parte desta tese.

**Tabela 2. Principais plantas amazônicas investigadas para atividade antimalárica pelo grupo de pesquisas em Manaus e resultados relevantes.**

<b>Especie</b>	<b>Familia</b>	<b>Princípios Químicos</b>	<b>Resultado</b>	<b>Fonte</b>
<i>Aspidosperma vargasii</i> , <i>A. desmanthum</i>	Apocinaceae	Elipticina, aspidocarpina;	Atividade antimalárica importante	(ANDRADE-NETO et al. 2007; HENRIQUE et al. 2010; POHLIT et al. 2012; ROCHA-E-SILVA et al. 2012)
<i>Cassia spruceana</i>	Fabaceae	Crisofanol, picetanol	Atividade antimalárica moderada	PINTO et al., em preparação
<i>Carapa guianensis</i>	Meliaceae	Limonóides gedunínicos	Atividade antimalárica moderada	Barbosa et al., submetido
<i>Picrolemma sprucei</i>	Simaroubaceae	Neosergeolida, Isobruceína B, derivados semi-sintéticos	Atividade antimalárica importante;	(ANDRADE-NETO et al. 2007; SILVA et al. 2009)
<i>Piper peltatum</i>	Piperaceae	4-nerolidilcatecol, derivados semi-sintéticos	Atividade antimalárica importante;	(ANDRADE-NETO et al. 2007; PINTO et al. 2010; PINTO et al. 2009; ROCHA-E-SILVA et al. 2011)
<i>Tachia grandiflora</i>	Gentianaceae	Decussatina, amplexina	Atividade antimalárica moderada	(POHLIT et al. 2012)
<i>Tabebuia incana</i>	Bignoniaceae	Furanonaftoquinonas,	Atividade antimalárica	MORAIS et al., em preparação

Plantas da família *Simaroubaceae* são amplamente usadas na medicina tradicional para o tratamento de malária, câncer, disenteria e outras doenças em países ao redor do mundo. Um dos principais grupos químicos nestas espécies responsáveis pela atividade biológica dos extratos são os quassinóides. Brucetina, simalikalactona D, quassina, brusatol e glaucarubinona são alguns dos quassinóides bem estudados e que exibem

uma ampla atividade biológica, incluindo antimalárica (GUO et al. 2005). As substâncias neosergeolida e isobruceína-B isoladas de *Picrolemma sprucei* e alguns de seus derivados semi-sintéticos já possuem sua atividade antimalárica *in vitro*, e atividade larvívica para *A. aegypti*, muito bem caracterizadas. Extratos do fruto e chás das folhas da planta nunca foram estudados para atividade antimalárica (ANDRADE-NETO et al. 2007; SILVA et al. 2009).

As espécies da família Piperaceae ocorrem com frequência na flora amazônica e são conhecidas na medicina popular por possuírem propriedades antiinflamatórias e antimaláricas. Extratos de *Piper peltatum* e *Piper umbelatum*, conhecidas popularmente como “caapeba” ou “caapeba do norte”, já foram testados *in vitro* e *in vivo* frente a espécies de *Plasmodium*, demonstrando atividade antimalárica (DE FERREIRA-DA-CRUZ et al. 2000). O composto majoritário na planta é o 4-nerolidilcatecol, um terpeno/fenil propanóide, a quem é atribuída a atividade antimalárica da planta (ANDRADE-NETO et al. 2007). Este composto será discutido com mais detalhes a seguir.

Plantas do gênero *Geissospermum* são popularmente conhecidas como pau-pereira, quinarana, quina-quina, acari, acariquara, acariquara branca, entre outros. A acariquara branca é muito usada em madeiras para construção civil, mas além desses usos, sua casca também possui propriedades medicinais. As cascas destas plantas são frequentemente utilizadas no preparo de medicamentos tradicionais empregados na medicina popular no tratamento de problemas hepáticos, febre, distúrbios estomacais, constipação, estimulante sexual e malária (LORENZI 2002).

*Cassia spruceana* é uma árvore das florestas da região Amazônica cuja raiz é utilizada na medicina tradicional na forma de infusões para o tratamento da malária entre outros usos. A química do gênero *Cassia* é altamente diversa e em geral consiste em compostos fenólicos que possuem uma variedade de propriedades biológicas e farmacológicas, entre eles a antimalárica (MILLIKEN, 1997).

*Tachia grandiflora* (Gentianaceae), popularmente conhecida como caferana é uma planta de porte arbóreo de ampla ocorrência na América do

Sul. Estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos tem descrito o uso tradicional de *Tachia* ssp. Contra febre e malária (MILLKEN 1997). Em trabalhos anteriores, extratos de *T. grandiflora* apresentaram pouca atividade antimalárica *in vitro* e boa atividade antimalárica *in vivo* em camundongos infectados com *P. berghei* (BRANDAO et al. 1997).

O gênero *Aspidosperma* Mart. pertence à família Apocynaceae e é distribuído em regiões neotropicais. Espécies desse gênero são conhecidas popularmente como peroba na maioria das regiões brasileiras e carapanaúba na região amazônica. A característica marcante desse gênero é a presença de alcaloides indólicos, principalmente os monoterpênicos, que conferem um amplo espectro de atividades biológicas, reconhecidas às espécies desse gênero, tais como antitumoral, antiplasmódica, e antibacteriana consistentes, em muitos casos, com suas utilizações populares (ANDRADE-NETO et al. 2007; HENRIQUE et al. 2010; SILVA et al. 2011).

Na Amazônia muitas espécies de *Aspidosperma* são utilizadas pelas populações indígena e cabocla por suas propriedades medicinais. A infusão da casca de algumas espécies, como *A. nitidum* e *A. album*, *A. discolor*, *A. excelsum* e *A. polineuron*, é utilizada no tratamento de malária. Das cascas de *A. desmanthum* e *A. vargasii* foram isolados respectivamente os alcaloides aspidocarpina e elipticina, substâncias com grande potencial antimalárico (ANDRADE-NETO et al. 2007; HENRIQUE et al. 2010; PASSEMAR et al. 2011; POHLIT et al. 2012; SILVA et al. 2011). Outros alcalóides indólico como uleína e olivacina com comprovada atividade antimalárica tem sido isolados de outras espécies de *Aspidospermas* como *A. olivaceum* e *A. ulei*. Posteriormente os alcalóides indólicos isolados de espécies de *Aspidosperma* serão discutidos com mais detalhes.

*Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae), popularmente conhecida como andiroba é uma árvore encontrado no oeste da Índia, África do Sul, e América do Sul onde é facilmente cultivada. O óleo de andiroba ou óleo de carapa como também é conhecido, é obtido a partir das sementes e tem várias utilizações na medicina tradicional, incluindo o tratamento de malária. A atividade antimalárica é atribuída aos limonóides presentes no óleo. O óleo de andiroba e uma fração

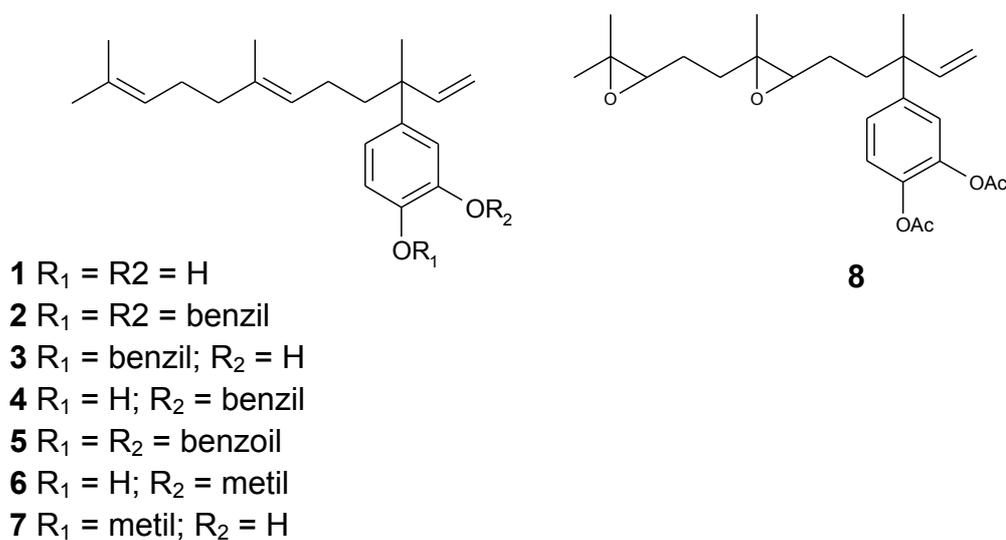
rica em limonóide obtida do óleo exibiram  $CI_{50}$  frente o *P. falciparum in vitro* de 9.4 e 2.4  $\mu\text{g/mL}$  (MIRANDA et al. 2012). Tanaka et al. (2012) isolaram 16 limonóides das flores de *C. guianensis*, 9 dos quais foram testados *in vitro* frente a cepa FCR-3 de *P. falciparum* ( $CI_{50}$  2.5-2.8  $\mu\text{M}$ ).

#### 1.1.7.1 4-nerolidilcatecol e seus derivados

4-nerolidilcatecol (**1**) é um terpeno/fenil propanóide natural abundante nas raízes de *P. peltatum* e *P. umbellatum*. Essa substância apresenta importante atividade antimalárica, anti-inflamatória e antioxidante, além de ser útil para a indústria de cosméticos (PINTO et al. 2010). **1** foi isolado e teve várias de suas atividades biológicas estudadas durante o mestrado da Dra. Ana Cristina Pinto (PPGQ/UFAM). A estrutura química de **1** está representada na figura 4.

O 4-nerolidilcatecol já foi estudado *in vitro* frente às cepas cloroquina-resistente K1 e cloroquina-sensível 3D7 de *P. falciparum*, além de isolados de campo da região amazônica. Frente a todas as linhagens estudadas **1** revelou uma ótima atividade com valores de  $CI_{50}$  na faixa entre 0,6 e 2,1  $\mu\text{g/mL}$  (ANDRADE-NETO et al. 2007; ROCHA-E-SILVA et al. 2011). Embora **1** tenha boa atividade antimalárica *in vitro*, é quimicamente instável e facilmente degradado.

Com o intuito de se melhorar a atividade antimalárica da substância e suas propriedades farmacológicas, a Dra. Ana Cristina Pinto preparou derivados de **1** como parte da sua tese de doutorado (PINTO 2008/PPGBIOTEC). Quatro de oito derivados semi-sintéticos de **1** apresentaram considerável ação antiplasmodial. Estas substâncias foram patenteadas pelo LAPAAM (WO/2009/082795). As estruturas dos derivados de **1** preparados no estudo estão representadas na figura 4.



**Figura 4. Estruturas do 4-nerolidilcatecol (1) e seus derivados semi-sintéticos 2-8** Fonte: PINTO et al. (2009)

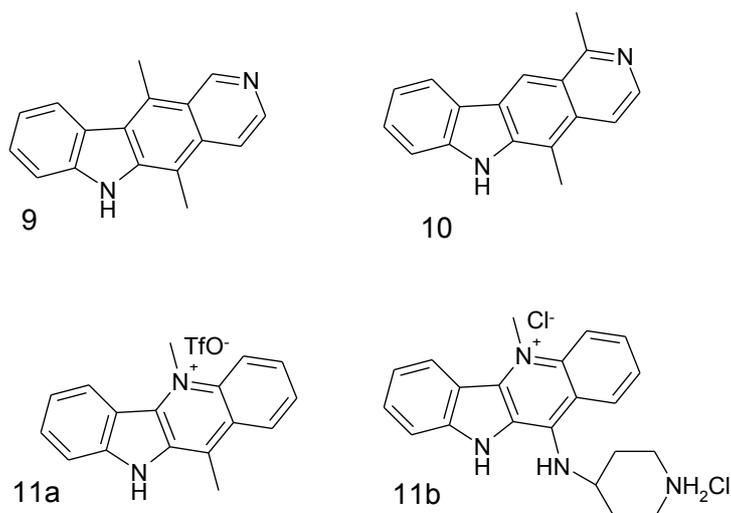
### 1.1.7.2 Elipticina e alcalóides indólicos análogos

Entre os produtos naturais, os alcaloides indólicos representam uma interessante e importante classe de compostos. *Screening in vitro*, tem revelado que várias substâncias desta classe apresentam atividade antimalárica com  $CI_{50}$ s na faixa submicromolar, e com ótimos índices de seletividade (FREDERICH et al. 2008; KAUR et al. 2009; PASSEMAR et al. 2011; WRIGHT 2005), porém a atividade *in vivo* tem sido confirmada para um número pequeno de compostos, da mesma forma que a elucidação dos seus mecanismos de ação precisa ser melhor estudada.

Nos últimos anos, o alcaloide indólico elipticina (**9**, figura 5) tem sido alvo de um grande número de estudos farmacológicos. A descoberta da atividade antiplasmodial deste composto foi realizada pelo LAPAAM, que o isolou do extrato etanólico alcalino das cascas de carapanaúba (*A. vargasii*). A substância exibiu uma significativa atividade antimalárica *in vitro* frente à cepa multi-resistente K1 de *P. falciparum*, com uma  $CI_{50}$  de 73 nM (ANDRADE-NETO

et al. 2007; HENRIQUE et al. 2010; POHLIT et al. 2012). Recentemente, outro estudo independente confirmou a atividade antimalárica *in vitro* de elipticina (PASSEMAR et al. 2011).

Outro alcalóide indólico amplamente estudado é a criptolepina (**11a**, figura 5), isolado da raiz *Cryptolepis sanguinolenta* (Apocynaceae), um arbusto originário do Oeste Africano. Criptolepina apresentou atividade *in vitro* ( $CI_{50} = 0,44 \mu\text{M}$ ) frente à cepa K1 de *P. falciparum* (WRIGHT et al., 2001), porém em estudos *in vivo* a atividade antimalárica não foi confirmada em doses mais baixas e em doses mais altas foi tóxico para os camundongos (CIMANGA et al. 1997; WRIGHT et al. 2001). Derivados de criptolepina apresentaram maior atividade antimalárica e menos toxicidade. Um dos derivados mais promissores é 2,7-dibromocriptolepina que apresentou potente atividade *in vitro* ( $CI_{50} = 50 \text{ nM}$ ) e uma importante supressão *in vivo* do *P. berghei* (89-91% na dose de 20-25 mg/kg /dia), porém possui efeitos mutagênicos/genotóxicos (GOPALAN et al. 2011).



**Figura 5: Estrutura dos alcalóides indólicos elipticina (9), olivacina (10), triflato de criptolepina (11a), derivado de criptolepina 11b.** (ROCHA-SILVA et al. 2012)

Recentemente Lavrado et al. (2011) sintetizaram vários análogos sintéticos de criptolepina com cadeias laterais aminoalquilas em C-11. Estas moléculas foram testadas *in vitro* para atividade citotóxica e antiplasmódica, e

uma das moléculas mais promissoras foi o hidrodicloridrato de 11-(4-piperidinamino)-criptolepina (**11b**, figura 5), que exibiu uma potente atividade inibitória ( $CI_{50} = 44$  nM) frente à cepa W2 de *P. falciparum* e foi o menos citotóxico de todos os compostos testados.

Olivacina (**10**, Figura 5) é um alcalóide raro isolado de *Aspidosperma olivaceum*. A atividade antitumoral de olivacina tem sido objeto de estudos por décadas, porém sua atividade antimalárica nunca foi evidenciada (BESSELIÈVRE e HUSSON 1981; GUILLONNEAU et al. 2005).

Estudos mecanísticos demonstraram que criptolepina e elipticina podem ter importantes efeitos inibitórios sobre a formação de hemozoina em *P. falciparum*. Ensaio químicos comprovaram que elipticina pode inibir o crescimento de cristais de heme (ou seja, a formação de hemozoina) em laboratório (CHONG e SULLIVAN 2003). Estudos revelam que a estrutura básica da criptolepina e análogos interage diretamente com as moléculas de heme inibindo o processo de formação de hemozoina (KUMAR et al. 2007; LAVRADO et al. 2011). O efeito anti-formação de hemozoina é sugerido como um possível mecanismo de ação desta classe de substâncias.

## **1.2 MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi realizado mediante parceria interdisciplinar e interinstitucional entre a Gerência de Malária da Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e o Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), bem como os cursos de Pós-Graduação em Biotecnologia e Química da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Conforme descrito ao longo da metodologia, algumas etapas do projeto foram realizadas nas seguintes instituições colaboradoras: Laboratório de Biologia da Malária e Toxoplasmose (LABMAT), do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN); Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais de Rondônia (IPEPATRO-FIOCRUZ) em Porto Velho, Rondonia; Laboratório de Malária do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) e Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ) em Belo Horizonte, Minas Gerais.

### **1.2.1 Material vegetal e substâncias químicas**

O estudo fitoquímico (extração, fracionamento e purificação de metabolitos secundários), além da semi-síntese de substâncias, foi realizado pela equipe de pesquisadores-bolsistas e alunos de pós-graduação orientados/supervisionados pelo Dr. Adrian M. Pohlit no LAPAAM/INPA.

Todas as espécies vegetais aqui utilizadas possuem indicação popular para o tratamento da malária de acordo com fontes da literatura científica. Foram selecionadas plantas cujo estudo fitoquímico já estava concluído ou em andamento no LAPAAM. O método detalhado de obtenção dos extratos, identificação botânica bem como isolamento e purificação das substâncias estão descritos nas teses aqui referenciadas. Segue abaixo uma descrição das amostras utilizadas no estudo conforme a origem.:

### **1.2.1.1 Obtenção dos extratos e frações de *Minquartia* e *Geissospermum***

Os extratos e frações de *Geissospermum argenteum* (Apocynaceae) e *Minquartia guianensis* (Olacaceae) foram preparados por Marlene Rodrigues, durante o mestrado junto ao Programa de Recursos Naturais (PRONAT) da Universidade Federal de Roraima (UFRR) em Boa Vista, Roraima (CAMARGO 2011). Os extratos foram testados *in vitro* frente à cepa K1 de *P. falciparum*.

### **1.2.1.2 Obtenção dos extratos e frações de *Tachia grandiflora***

Os extratos e frações de *Tachia grandiflora* (Gentianaceae) foram preparados por Elba Vieira Mustafa dos Santos durante o mestrado junto ao Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ) da UFAM (POHLIT et al. 2012). Os extratos foram testados *in vitro* frente à cepa K1 de *P. falciparum*.

### **1.2.1.3 Obtenção dos extratos de *Cassia spruceana***

Os extratos metanólicos e etanólicos de *C. spruceana* foram produzidos pela Dra. Patrícia de Souza Pinto durante sua dissertação de mestrado junto ao PPGQ/UFAM (2006). Os extratos foram testados *in vitro* frente à cepa K1 de *P. falciparum*.

### **1.2.1.4 Obtenção dos extratos e frações de *Picrolemma sprucei*, e da *neosergeolida***

O estudo fitoquímico de *Picrolemma sprucei* Hook. f. (Simaroubaceae) foi realizado pelo Dr. Rodrigo Cesar das Neves Amorim durante sua tese de doutorado no PPGBIOTEC/UFAM (2009). O método de preparação dos extratos foi publicado em Amorim et al. (2014) aceito para publicação na revista

Fitos. Extratos do fruto e infusões das folhas, raízes e caule de *P. sprucei* foram testados *in vitro* frente a cepa K1 de *P. falciparum*.

A substância neosergeolida utilizada nos testes *in vitro* com *P. vivax* foi isolada da raiz *P. sprucei* pelo Dr. Rodrigo Amorim e pela Dra. Ellen Cristina Silva drante sua dissertação de mestrado no PPGQ/UFAM (2006). O método de isolamento está descrito em Silva et al. (2009).

#### **1.2.1.5 Obtenção dos extratos e frações de *Aspidosperma* spp.**

Foram avaliados para atividade antimalárica *in vitro* extratos e frações de 8 espécies de *Aspidosperma* de ocorrência na Amazônia: *A. araracanga*, *A. desmanthum*, *A. vargasii*, *A. marcgravianum*, *A. sandwithianum*, *A. nitidum*, *A. spruceanum* e *A. schultesii*. Estes extratos e frações foram preparados durante o trabalho de mestrado da Dra. Marycleuma Campos Henrique no Programa de Pós-Graduação em Química da UFAM, onde os métodos de extração e fracionamento estão descritos detalhadamente (HENRIQUE et al. 2010). Um total de 36 amostras entre extratos e frações das 8 espécies de *Aspidosperma* foram testados neste estudo.

#### **1.2.1.6 Obtenção dos óleos essenciais de espécies vegetais do nordeste brasileiro e seus compostos majoritários**

*Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae), *Lippia sidoides* (Verbanaceae) e *Croton zehntneri* (Euphorbiaceae) são plantas aromáticas nordestinas da região de caatinga utilizadas popularmente para o tratamento da malária. O estudo fitoquímico destas espécies foi realizado por Magali Mota, durante o mestrado em Biologia Parasitária junto à Universidade Federal de Rio Grande do Norte (UFRN). Estragol, timol e  $\alpha$ -bisabolol são respectivamente os compostos majoritários nos óleos essenciais de *C. zehntneri*, *L. sidoides* e *V. arborea*, e foram obtidos conforme descrito em Mota et al. (2012).

### 1.2.1.7 Obtenção dos alcalóides indólicos

A elipticina (**9**) utilizada neste trabalho foi isolada de *A. vargasii* conforme descrito em Andrade-Neto et al. (2007) e Henrique et al. (2010) ou comprada da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Triflato de criptolepina (**11a**) e seu análogo hidrocloreto de 11-(4-piperidinamino) criptolepina (**11b**) foram obtidos por síntese como descrito em Lavrado et al. (2008) e cedidos pelo Dr. Rui Moreira da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Portugal. Olivacina (**9**) foi isolada das cascas de *Aspidosperma olivaceum* por extração ácido-base. A planta foi coletada no Estado de Minas Gerais. Essa amostra foi cedido pelo Prof. Angelo da Cunha Pinto do Instituto de Química da Universidade Federal de Rio de Janeiro (UFRJ). Outras informações sobre essas substâncias encontram-se em Rocha e Silva et al. (2012).

Os alcalóides indólicos 20-*epi*-dasicarpidona (**16**), Ác. 12-hidroxi-N-acetil-21(N)-deidroplumerano-18-óico (**17**), 19E-hunteracina (**18**), 20(E)-16,17-nor-subincanadina E (**19**) e 3,4,5,6-tetradesidro- $\beta$ -ioimbina (**20**), foram isolados de extratos etanólicos de diferentes partes de *Aspidosperma ulei* Markgr pela Dra. Zelina Estevam dos Santos Torres como parte de sua tese de doutorado no Programa de Pós-graduação em Química na Universidade Federal do Ceará (TORRES, 2013). Detalhes sobre o método de isolamento e caracterização destas substâncias estão descritos em Torres et al. (2013).

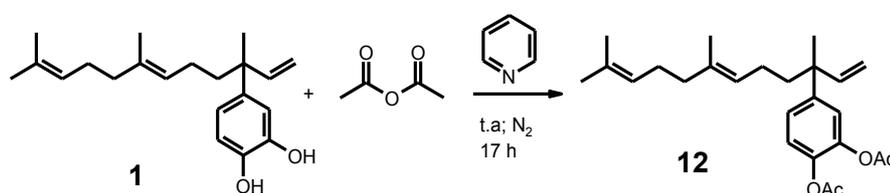
### 1.2.1.8 Obtenção dos limonóides de *Carapa guianenses*

Os limonóides 6 $\alpha$ -acetoxiazadiradiona (**21**), andirobina (**22**), 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (**23**) e 7-deacetil-7-oxogedunina (**24**) foram isolados do resíduo das sementes de *C. guianenses*, e o limonóide e 6 $\alpha$ -hidroxiacetilgedunina (**25**) foi obtido por semi-síntese a partir de **23**. O isolamento e semi-síntese dos limonóides foi realizada por Tiago Barbosa Pereira durante sua dissertação de mestrado no PPGQ/UFAM (2013) onde estão descritos os métodos.

### 1.2.1.9 Isolamento de 4-nerolidilcatecol (1) e obtenção dos derivados

A obtenção de **1** e a produção e de seus derivados foi realizada por mim em colaboração com a Dra. Ana Cristina da Silva Pinto, pesquisadora-bolsista do INPA, e o material vegetal foi fornecido pelo Dr. Francisco Célio Maia Chaves da EMBRAPA. O 4-nerolidilcatecol foi obtido do extrato  $\text{CHCl}_3$ : EtOH (1:1) das raízes secas e pulverizadas de *P. peltatum*, sendo posteriormente isolado em coluna cromatográfica utilizando  $\text{CHCl}_3$ : EtOH (9:1) como eluente, conforme descrito em Rocha-e-Silva et al. (2011). A partir do **1** purificado foram produzidos os três derivados semi-sintéticos utilizados no estudo conforme descrito em Pinto et al. (2009), onde também estão os dados de NMR, HRMS.

O derivado *O,O*-diacetil-4-nerolidilcatecol (**12**) foi preparado por diacetilação de **1** pela adição de anidrido acético ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) e piridina ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ), deixando-se sob agitação e nitrogênio por 17 h. O tratamento pós-reacional foi feito pela adição de 3 mL de água destilada ao meio reacional seguida de extração com clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ), lavagem com solução de HCl 0,1 N, solução saturada de bicarbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ ), água destilada e solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) anidro e concentrado em rotaevaporador, obtendo-se o derivado na forma bruta. Este foi purificado por CC *flash* com mistura de Hex: AcOEt (8:2) e MeOH, obtendo-se o derivado diacetilado **12**, com rendimento de 90,2%, identificado por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , IV. A reação está resumida na Figura 6 abaixo.



**Figura 6:** Esquema da reação de síntese do derivado *O,O*-diacetil-4-nerolidilcatecol (**12**) a partir de 4-nerolidilcatecol (**1**).

O derivado 2-O-benzil 4-nerolidilcatecol (**4**) foi obtido por O-benzilação e o derivado 1,2-O,O-dibenzoil 4-nerolidilcatecol (**5**) foi obtido por reações de O-benzolilação durante a tese da Dra. Ana Cristina da Silva Pinto (2009).

#### **1.2.1.10 Endoperóxidos sintéticos**

Foram avaliados compostos sintéticos produzidos por Lucas Lopardi Franco durante seu mestrado no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais. Estes compostos tiveram sua estrutura química preconizada baseada na estrutura do composto natural curcumina com importante atividade antimalárica, os compostos também possuem grupos endoperóxidos que é o grupo responsável pela atividade antimalárica da artemisinina. Derivados dihidroperóxidos e tetraoxanos, obtidos a partir de substituintes simétricos de dimetilaryl-acetonas, foram sintetizados por vários métodos como descrito em Franco et al., (2012). Foram avaliados para atividade antimalárica *in vitro* nove destes compostos.

#### **1.2.2 Cultivo *in vitro* do *Plasmodium falciparum***

O cultivo *in vitro* do *P. falciparum* e a maioria dos testes de atividade antimalárica *in vitro* foram realizados no Laboratório de Cultivo da Gerência de Malária da FMT-HVD. Algumas amostras foram testadas no Laboratório de Malária do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) em colaboração com o Dr. Alejandro Katzin, no Laboratório de Quimioterapia da Malária do Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais de Rondônia (IPEPATRO-FIOCRUZ) em colaboração com a Dra. Eliete Afonso Mesquita, e no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou da FIOCRUZ de Minas Gerais (CPqRR-FIOCRUZ) em colaboração com a Dra. Antoniana Ursine Krettl.

As cepas de *P. falciparum* utilizadas no estudo foram a K1 (MRA-159, MR4, ATCC, Manassas Virginia), a W2 (MRA-157, MR4, ATCC, Manassas

Virginia) e o clone 3D7 do isolado NF54 (MRA-102, MR4, ATCC, Manassas Virginia), obtidas após cadastramento da gerência de malária no Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4), Estados Unidos.

O método de cultivo *in vitro* do *P.falciparum* foi uma modificação da técnica de Träger e Jensen (1976) adaptada pelo laboratório de malária da FMT-HV e baseia-se no desenvolvimento laboratorial dos estágios eritrocitários desta espécie parasitária. Após a realização do descongelamento das amostras, os parasitos são mantidos a 37°C em frascos de poliestireno de 25 mL hermeticamente fechadas, às quais é adicionada uma mistura de gases para manter uma micro-atmosfera de baixa tensão de oxigênio (5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> e nitrogênio balanceado). Em cada frasco de cultivo é adicionada suspensão de eritrócitos suficiente para a obtenção de 500 µL de sangue parasitado e 4,5 mL de solução composta por meio RPMI 1640 suplementado com 32 mM NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM HEPES (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S), 12 mM TES (ácido sulfônico-N-tris [hidroximetil]-metil-2-aminoetano), 37 mM hipoxantina, 2 mM glutamina, 10 mM glicose e 10% de plasma humano tipo A+.

O meio de cultura foi trocado diariamente. Todo o procedimento de descongelamento e manutenção das culturas foi realizado em ambiente de total assepsia (câmara de fluxo laminar). O acompanhamento do crescimento parasitário foi realizado a cada 24 h, durante o procedimento de troca do meio de cultura e adição da mistura de gases. A contagem de parasitos viáveis foi feita pela observação de estendidos hematológicos corados pelo método panótico<sup>®</sup> (Laborclin, Brasil). A parasitemia foi calculada na forma de percentual de formas eritrocíticas viáveis observadas durante a contagem de 2000 hemácias. Culturas sincrônicas, na fase de anel, foram obtidas por dois tratamentos consecutivos, em intervalos de 48 h com uma solução 5% de D-sorbitol (Sigma-Aldrich, Alemanha) (p/v) como descrito por Lambros et al (1979).

### 1.2.3 Microteste de susceptibilidade *in vitro*

Para avaliação da atividade antimalárica *in vitro* dos extratos, frações e substâncias puras, foi realizado um *screening* onde as amostras foram testadas em duas concentrações, 50 e 5 µg/mL. Para as amostras que se mostraram ativas no primeiro teste com uma inibição de acima de 80% na maior concentração, foi determinada a concentração que inibe 50% do crescimento (CI<sub>50</sub>) utilizando sete concentrações determinadas a partir do resultado dos *screening* inicial. Dois métodos foram adotados ao longo do estudo. O método por análise microscópica e o método de incorporação da [<sup>3</sup>H]-hipoxantina.

#### 1.2.3.1 Método por análise microscópica

O microteste foi realizado segundo metodologia descrita por Rieckmann et al. (1978), com modificações descritas por Andrade-Neto et al. (2007). Soluções estoques das amostras foram inicialmente preparadas em dimetilsulfoxido (DMSO) na concentração de 5 mg/mL, e posteriormente diluídas em meio de cultura (RPMI-1640) de modo a obter sete concentrações finais especificadas para cada amostra. As drogas padrão cloroquina e quinina foram testadas em sete concentrações variando de 2,0 a  $3,4 \times 10^{-3}$  µg/mL. Cada diluição foi testada em duplicata em placa de 96-poços contendo suspensão de hemácias parasitadas com hematócrito de 2% e parasitemia inicial de 1% sincronizada no estágio anel. O volume final de cada poço foi de 200 µL. Poços contendo somente hemácias parasitadas em meio de cultura representaram o controle de crescimento. A placa foi incubada por 48 h a 37°C e baixa tensão de O<sub>2</sub> nas mesmas condições da cultura. Após a incubação foram confeccionados esfregaços sanguíneos com o conteúdo de cada poço e corados pelo Panótico® sendo posteriormente examinados no microscópio óptico, onde se contou a quantidade de parasitos presentes num total de 2.000 hemácias. A parasitemia foi expressa em porcentagem. A concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) foi calculada com o auxílio do software Microcal Origin 8.1® (OriginLab).

### 1.2.3.2 Teste pelo método da incorporação da [<sup>3</sup>H]-hipoxantina

O teste de incorporação de [<sup>3</sup>H]-hipoxantina (RIECKMANN et al. 1978) foi realizado conforme modificações descritas em Andrade-Neto et al., (2004). Os extratos e frações das oito espécies de *Aspidosperma* foram as únicas amostras testadas por este método, como parte de um treinamento realizado no IPEPATRO-FIOCRUZ em Rondonia e no CPqRR-FIOCRUZ Minas Gerais.

Culturas da cepa W2 de *P. falciparum* foram mantidas em meio de cultura sem hipoxantina por quatro dias, com hematócrito e parasitemia ajustado para 1%. Em microplaca de 96 poços, 180 µL da suspensão de hemácias parasitadas foram incubados com 20 µL de solução das drogas em sete concentrações. Poços controles presentes na placa só receberam suspensão de hemácias parasitadas. Após 24 h de incubação foi adicionado a cada poço da placa 20µL de [<sup>3</sup>H]-hipoxantina (0,5 µCi), e a placa foi incubada por mais 24 h, totalizando 48 h de incubação. Posteriormente a placa foi congelada por 24 h e descongelada para a lise das hemácias. O lisado foi filtrado em papel de filtro para impregnação do DNA, com o auxílio do equipamento *cell-harvesting* (Tomtec 96-Harvester). O papel de filtro foi posto em um envelope de plástico e imerso em líquido de cintilação sendo posteriormente selado. A emissão da radiação foi contada usando um *beta counter* (PerkinElmer). As médias dos resultados das leituras foram plotadas no software Microcal Origin® e as CI<sub>50</sub>s foram determinadas.

### 1.2.4 Teste *in vitro* com isolados de campo de *Plasmodium vivax*

Os testes *in vitro* com cultura limitada de isolados de campo de *P. vivax* foram realizados no Laboratório de Cultura FMT-HVD em colaboração com a Dra. Yonne Francis Chehuan. Para estes ensaios foram selecionadas três substâncias ativas *in vitro* frente o *P. falciparum* e representativas de diferentes classes de produtos naturais: neosergeolida (quassinóide), elipticina (alcalóide)

e *O,O*-diacetil-4-nerolidilcatecol (fenil/propanóide). O método utilizado foi o descrito por Druilhe et al., (2007) com modificações descritas em Chehuan et al., (2013).

#### **1.2.4.1 Aspectos éticos**

O estudo foi conduzido com pacientes voluntários que, após entrevista individual, entenderam os objetivos do estudo e aceitaram participar através do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) dentro dos preceitos da ética em pesquisa com humanos, sem prejuízo para o seu atendimento ou seu tratamento. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado protocolo número 339.265 (Anexo 2).

#### **1.2.4.2 Amostras de *Plasmodium vivax***

Neste estudo foram utilizadas 18 amostras de sangue de pacientes monoinfectados com *P. vivax*, oriundos da rotina de diagnóstico de malária na FMT-HDV, com parasitemia mínima de 1000 parasitos assexuados/ $\mu$ L de sangue, idade igual ou maior que 18 anos, de ambos os sexos, sem quadro clínico de malária grave, e sem uso de antimaláricos nos últimos 30 dias. De cada paciente foram coletados 5 mL de sangue venoso em tubos vacuntainer® com anticoagulante EDTA através de punção da veia do antebraço. O sangue colhido passou por um processo de centrifugação (2000 rpm a 10 min, temperatura ambiente). O plasma foi retirado e as hemácias lavadas com uma solução de meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Alemanha).

#### **1.2.4.3 Microteste *in vitro* com *Plasmodium vivax***

Soluções estoques das substâncias naturais foram preparadas na concentração de 5 mg/mL e posteriormente diluídas em sete concentrações,

sendo elipticina e *O,O*-diacetil-4-nerolidilcatecol em concentrações variando de 100-0,006 µg/mL e neosergeolida de 10-0,0006 µg/mL. As drogas padrão mefloquina e dihidroartemisinina foram testadas nas concentrações variando de 100-0,14 ng/mL e cloroquina de 1000-1,4 ng/mL. Cada concentração de amostra foi testada em duplicata. Poços controle na placa não receberam droga.

Preparou-se uma suspensão de hemácias parasitadas com hematócrito de 2% em meio completo específico para *P. vivax*, constituído de uma mistura 1:3 (v/v) de meio Waymouth (Sigma-Aldrich) e meio RPMI 1640 contendo HEPES (25 mM), NaHCO<sub>3</sub> (25 mM), hipoxantina (10 µg/L) suplementado com plasma humano do tipo AB+. Foram aplicados 180 µL desta suspensão nos poços da placa que já continham 20 µL de solução diluída de droga. A placa foi incubada com mistura carbogênica (5 % CO<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub> e 90 % N<sub>2</sub>) por 48 h a 37°C. Foram confeccionados esfregaços sanguíneos dos poços controle após 24 e 48 h de incubação para o acompanhamento da maturação dos esquizontes. Após a incubação a placa foi congelada a -20°C até a realização do ELISA-Sanduiche.

#### **1.2.4.4 Técnica do DELI-Test (*double-site enzyme linked LDH immunodetection*)**

Placas de 96 poços foram sensibilizadas de um dia para o outro (*overnight*) a 4°C com os anticorpos de captura (Mab 11D 5µg/mL), específicos para pLDH de *P. vivax* (Vista diagnostics, EUA), diluídos em tampão salina-fosfato (*phosphate-buffered saline*-PBS, Sigma-Aldrich) com 0,5% de albumina bovina (*bovine serum albumin*-BSA, Sigma-Aldrich), sendo posteriormente lavadas com PBS-BSA 0,5% e bloqueadas com PBS-BSA 1%. Após o período de incubação de 48 h à 37°C as hemácias foram lisadas por três ciclos de congelamento e descongelamento para a liberação da pLDH. 100 µL do lisado de cada poço foi transferido para a placa sensibilizada anteriormente com o anticorpo monoclonal MAb 11D, que reage com a pLDH de *P. vivax* e incubados durante 1 h em câmara úmida à temperatura ambiente. Após cinco

lavagens com PBS-BSA 0,5% foi adicionado o segundo anticorpo monoclonal biotilado MAb 19G7 nas placas e incubou-se por 1 h em câmara úmida à temperatura ambiente. Após cinco lavagens com PBS BSA- 0,5%, as placas foram incubadas com estreptavidina-peroxidase (Roche diagnostics) durante 30 min à temperatura ambiente. Depois de nove lavagens com PBS-BSA 0,5%, o substrato TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina, Invitrogen) foi adicionado. Após 10 min ao abrigo da luz e temperatura ambiente a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 1 M. As placas foram lidas em um espectrofotômetro para microplacas (Expert Plus, Asys) em comprimento de onda de 450 nm sendo aferida a densidade óptica (DO).

Os valores de densidade óptica produzidos por cada poço da placa de ELISA correspondem à concentração da proteína pLDH encontrada nas amostras de cultura após 48 h de incubação, e representam indicadores consistentes de crescimento de parasito. A inibição do crescimento dos parasitos foi determinada pela comparação da média das duplicatas de cada concentração, com a média dos controles sem droga, e a CI<sub>50</sub> foi calculada mediante regressão linear utilizando o software Microcal Origin®.

### 1.2.5 Tratamento estatístico

O teste do *qui-quadrado* ou o teste de Fischer foi utilizado para determinar a existência de diferenças entre as proporções. Já o coeficiente de correlação entre variáveis quantitativas foi determinado pelo teste paramétrico de *Pearson* ou pelo teste não-paramétrico de *Spearman*. Finalmente, para análise de concordância entre os métodos foi utilizado o coeficiente kappa. Nível de significância  $p \leq 0,05$ .

### 1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados se referem ao estudo *in vitro* de extratos, frações e substâncias isoladas de plantas amazônicas e dos seus derivados semi-sintéticos. Foram incluídos também resultados obtidos com óleos essenciais de três plantas nordestinas e seus compostos majoritários, e substâncias sintéticas estruturalmente baseadas nos produtos naturais como análogos de criptolepina e alguns endoperóxidos inspirados na estrutura da curcumina. Sempre foi objetivo identificar os melhores compostos candidatos a novas drogas antimaláricas a serem testados na etapa seguinte *in vivo*.

O estudo de atividade antimalárica *in vitro* é considerado o ponto de partida para a triagem e descoberta de novas drogas e é o método pelo qual todos os atimaláricos atuais foram descobertos. Da mesma forma em estudos de bioprospecção onde a atividade biológica é utilizada como base para se isolar o princípio ativo de uma planta, testes antimaláricos *in vitro* são a principal ferramenta. Diversas técnicas tem sido desenvolvidas nos últimos anos visando melhorar e acelerar este processo, porém a microscopia e o método de radioisótopos continuam sendo considerados o padrão ouro (AGUIAR et al. 2012).

Na maioria dos testes realizados aqui a quantificação dos parasitos se deu através da contagem e avaliação morfológica dos parasitos por microscopia óptica, o que limitou o número de amostras a serem testadas, porém foi a única técnica disponível em Manaus até a finalização deste trabalho. 36 amostras (extratos e frações de 8 espécies de *Aspidosperma*) foram testados pelo método radioisotópico de incorporação de [<sup>3</sup>H]-hipoxantina, como parte de um treinamento realizado no IPEPATRO/RR e no CPqRR/MG visando uma futura implementação deste método no INPA em Manaus, o que não foi possível acontecer no período de desenvolvimento desta tese por motivos técnicos e estruturais.

Foram selecionadas 73 extratos e frações de 16 espécies vegetais (sendo 8 *Aspidospermas* e 3 espécies nordestinas) para esta triagem. As amostras foram escolhidas com base na forte indicação popular antimalárica

relatada na literatura e na robustez do estudo químico realizado anteriormente. Em alguns casos as substâncias, extratos e frações estavam armazenados no banco de extratos do LAPAAM e haviam sido estudadas quimicamente pelos alunos de pós-graduação conforme mencionado na metodologia, porém em o teste antimalárico não foi realizado em paralelo por falta da oferta do teste no período dos estudos químicos antes de 2007.

Serão descritos e discutidos a seguir os resultados de testes *in vitro* alcançados com extratos vegetais, substâncias isoladas de plantas e seus derivados semi-sintéticos e um grupo de substâncias sintéticas (endoperóxidos) cuja estrutura foi idealizada com base em duas moléculas naturais: a curcumina e a artemisinina.

### 1.3.1 Atividade antimalárica *in vitro* de extratos vegetais e frações

Os resultados aqui apresentados são da atividade antimalárica *in vitro* frente à cepa K1 cloroquina resistente de *P. falciparum*. O estudo químico e seus resultados constituem partes de dissertações de mestrado e teses de doutorado conforme descrito no item 1.2.1 da metodologia. Alguns destes trabalhos já estão publicados e outros estão em fase de preparação dos manuscritos. Todas as amostras descritas no item 1.2.1 da metodologia foram testadas *in vitro*. Os critérios para classificação da atividade biológica dos extratos e frações foram os convencionados na literatura (BERTANI et al. 2005; KRETTLI et al. 2001):

#### Concentração Inibitória 50% (CI<sub>50</sub>):

- Maior que 50 µg/mL = inativo (**I**)
- Entre 50 µg/mL e 10 µg/mL = parcialmente ativo (**PA**)
- Entre 10 µg/mL e 1,0 µg/mL = ativo (**A**)
- Menor que 1,0 µg/mL = muito ativo (**MA**)

### 1.3.1.1 Extratos e frações vegetais de plantas amazônicas

Estudos *in vitro* de extratos vegetais constituem a etapa preliminar na confirmação da ação antimalárica relatada pelo uso popular e o principal critério para investimentos em estudos fitoquímicos de isolamento e identificação de novos princípios ativos em plantas. A tabela 3 apresenta a concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) em µg/mL dos extratos e frações de cinco espécies vegetais amazônicas ensaiados *in vitro* frente à cepa K1 de *P. falciparum* pela análise microscópica.

Na região Amazônica, plantas são amplamente utilizadas pela medicina tradicional para o tratamento de malária. Em 1997 Milliken escreveu um levantamento da literatura sobre plantas utilizadas para o tratamento de malária, febre e condições semelhantes por pessoas da região da Amazônica e do Caribe (MILLKEN 1997; POHLIT et al. 2013). Neste trabalho foram testadas plantas que ocorrem e são utilizadas nesta região: *Aspidosperma* spp (Apocynaceae), *Cassia spruceana* (Fabaceae), *Geissospermum argenteum* (Apocynaceae), *Minqartia guianensis* (Olacaceae), *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae) e *Tachia grandiflora* (Gentianaceae).

*C. spruceana* é conhecida popularmente como mari-mari-da-terra-firme e é utilizada tradicionalmente para tratamento de malária. Os extratos de *C. spruceana* (1 e 2) foram considerados inativos ao apresentarem CI<sub>50</sub> maiores de 50,0 µg/mL (tabela 3). Pinto (2006) isolou dois polifenóis das raízes de *C. spruceana* (crisofanol e picetanol), os quais também foram testados frente a cepa K1 de *P. falciparum* e não apresentaram atividade (dados não mostrados).

As amostras de 3 a 8 da tabela 3 referem-se a extratos brutos de partes de *G. argenteum*, e as amostras 7 a 12 se referem a extratos de *M. guianensis*. Estes extratos foram preparados pela aluna de pós-graduação Marlene Rodrigues como parte de sua dissertação de mestrado. Cinco dos seis extratos de *G. argenteum* se mostraram ativos com as CI<sub>50</sub> abaixo de 10,0 µg/mL, sendo o extrato metanólico das cascas o mais ativo com CI<sub>50</sub> de 4,6 µg/mL.

**Tabela 3: Atividade antimalárica *in vitro* de extratos e frações obtidos de espécies vegetais da flora amazônica frente à cepa K1 de *P. falciparum*.**

Espécie Vegetal	N.	Parte	Ex/Fr <sup>a</sup>	Solvente	Cl <sub>50</sub> [µg/mL]	Classificação da atividade <sup>b</sup>
<i>Cassia spruceana</i>	1	raiz	Ex	MeOH	> 50,0	I
	2	raiz	Ex	H <sub>2</sub> O	> 50,0	I
<i>Geissospermum argenteum</i>	3	casca	Ex	H <sub>2</sub> O	> 50,0	I
	4	folhas	Ex	H <sub>2</sub> O	9,0	A
	5	galhos	Ex	H <sub>2</sub> O	15,4	PA
	6	casca	Ex	MeOH	4,6	A
	7	folhas	Ex	MeOH	6,9	A
	8	galhos	Ex	MeOH	6,6	A
<i>Minquartia guianensis</i>	9	casca	Ex	H <sub>2</sub> O	20,0	PA
	10	folhas	Ex	H <sub>2</sub> O	> 50,0	I
	11	galhos	Ex	H <sub>2</sub> O	> 50,0	I
	12	casca	Ex	MeOH	> 50,0	I
	13	folhas	Ex	MeOH	12,0	PA
	14	galhos	Ex	MeOH	> 50,0	I
<i>Picrolemma sprucei</i>	15	frutos	Ex	EtOH	0,6	MA
	16	pericarpo	Ex	EtOH	1,5	A
	17	pericarpo	Fr	Hex	9,1	A
	18	pericarpo	Fr	CHCl <sub>3</sub>	0,01	MA
	19	pericarpo	Fr	AcOEt	0,2	MA
	20	pericarpo	Fr	n-ButOH	1,1	A
	21	pericarpo	Fr	EtOH/H <sub>2</sub> O	0,6	MA
	22	semente	Ex	EtOH	0,2	MA
	23	semente	Fr	Hex	3,7	A
	24	semente	Fr	CHCl <sub>3</sub>	0,01	MA
	25	semente	Fr	AcOEt	0,1	MA
	26	semente	Fr	n-ButOH	0,3	MA
	27	semente	Fr	EtOH/H <sub>2</sub> O	0,1	MA
	28	raiz	Ex	H <sub>2</sub> O	0,7	MA
29	folha	Ex	H <sub>2</sub> O	0,5	MA	
30	caule	Ex	H <sub>2</sub> O	0,2	MA	
<i>Tachia grandiflora</i>	31	folhas	Ex	EtOH	> 50,0	I
	32	folhas.	Fr	CHCl <sub>3</sub>	35,8	PA
	33	raiz	Ex	MeOH	> 50,0	I
	34	raiz	Fr	CHCl <sub>3</sub>	10,5	PA

<sup>a</sup>Natureza da amostra: Ex=Extrato, Fr=Fracionamento.

<sup>b</sup>Classificação da Atividade baseado na Cl<sub>50</sub>: MA=muito ativo (< 1,0 µg/mL), A=ativo(entre 10 e 1,0 µg/mL), PA=parcialmente ativo (entre 10,0 e 50,0 µg/mL) e I=inativo (>50,0 µg/mL).

Plantas do gênero *Geissospermum* possuem reputação antimalárica em vários países da América do Sul, e nos últimos 20 anos vários autores realizaram estudos de atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* com estes extratos (BRANDAO et al. 1997; MILLKEN 1997). Dos extratos de *G. argenteum*, o extrato metanólico das cascas foi o que mostrou melhor atividade antimalárica *in vitro* ( $CI_{50} = 4,6 \mu\text{g/mL}$ ). Dois dos extratos de *M. guianensis* apresentaram atividade moderada, enquanto os demais extratos desta planta não mostraram atividade ( $CI_{50} > 50,0 \mu\text{g/mL}$ ). Na literatura pesquisada não foram encontrados relatos de estudos da atividade antimalárica de extratos de *M. guianensis* realizados no Brasil e poucos trabalhos foram encontrados para a atividade antiplasmódica desta espécie em outras localidades (CAMARGO 2011).

A *T. grandiflora* e *P. sprucei* são duas espécies popularmente conhecidas como caferana. (KRETTLI et al. 2001; POHLIT et al. 2012). As amostras 15 a 18 da tabela 3 se referem a extratos e frações de *T. grandiflora*, selecionados por possuírem substâncias isoladas (POHLIT et al. 2012). Os extratos brutos da raiz e folha de *T. grandiflora* foram considerados inativos por apresentarem  $CI_{50}$  maior que  $50,0 \mu\text{g/mL}$ , enquanto as frações clorofórmicas do extrato da raiz e do extrato das folhas apresentaram  $CI_{50}$  de 10,5 e 35,8  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, consideradas com atividade moderada. A inatividade dos extratos de *Tachia sp.* também foi evidenciada por estudos do grupo da Dra. Krettli (BRANDAO et al. 1992; CARVALHO e KRETTLI 1991). Através da partição líquido-líquido dos extratos polares foi possível obter as frações clorofórmicas que possivelmente concentraram metabólitos ativos. Das frações clorofórmicas do extrato metanólico da raiz e folha de *T. grandiflora* foram isoladas respectivamente a xantona decusatin e a substância amplexina, um raro sec-iridóide monoterpênico com  $CI_{50}$  de 7,0  $\mu\text{g/mL}$  frente à cepa W2 de *P. falciparum* relatado recentemente na literatura. Dados do nosso grupo de pesquisa revelaram que estes extratos apresentaram baixa atividade citotóxica *in vitro* com  $CI_{50}$  frente à fibroblastos humanos (MCR-5) maiores  $50,0 \mu\text{g/mL}$  (ROCHA-E-SILVA et al. 2013).

O gênero *Picrolemma* é composto somente por duas espécies: *P. huberi* e *P. spupei* Hook.f.. Ambas as espécies são nativas e encontradas

exclusivamente na região Amazonica. *P. sprucei* é utilizada pela medicina tradicional pra tratamento da malária no Peru, Brasil, e Guiana Francesa (MILLKEN 1997; SILVA et al. 2009). A principal forma de utilização popular da planta é na forma de infusão. Aqui as infusões das diversas partes de *P. sprucei* foram consideradas muito ativas com valores de  $CI_{50}$  menores que  $1 \mu\text{g/mL}$ . As amostras 15 a 27 da tabela 3 referem-se a extratos e frações do fruto de *P. sprucei*. Até o presente momento, foram publicados estudos sobre a composição química dos caules, raízes e folhas, bem como a atividade antimalárica *in vitro* de quassinóides isolados a partir da raiz da planta, porém não foram encontrados dados na literatura em relação à composição química e atividade biológica do fruto dessa espécie (AMORIM e POHLIT 2006; ANDRADE-NETO et al. 2007). Este trabalho provê a primeira informação fitoquímica e biológica dos extratos do fruto desta planta, tão difundida e utilizada nos países da América do Sul (AMORIM et al. 2014, aceito para publicação).

Na análise geral, todos os extratos e frações do fruto inteiro, pericarpo e sementes se mostraram ativos frente à cepa K1 de *P. falciparum* usada no teste, ao apresentarem valores de  $CI_{50}$  menores que  $10,0 \mu\text{g/mL}$ . As frações clorofórmicas do pericarpo e da semente foram as que apresentaram maior atividade, com  $CI_{50}$  de  $0,01 \mu\text{g/mL}$ . No estudo químico estas foram as frações que apresentaram maior concentração dos quassinóides neosergeolida e isobruceína B, as substâncias química responsáveis pela atividade antimalárica com  $CI_{50}$ s na faixa de nanomolar relatada em estudos anteriores do LAPAAM (ANDRADE-NETO et al. 2007; SILVA et al. 2009). Outras frações que não continham estes quassinóides também apresentaram uma elevada atividade antimalárica, abrindo a possibilidade do estudo de outras substâncias ativas no fruto (dados não mostrados). Estes dados fazem parte de um manuscrito aceito para publicação (AMORIM et al., 2014, FITOS).

### 1.3.1.2 Extratos e frações de *Aspidosperma* sp

Foram avaliados para atividade antimalárica *in vitro* 36 extratos e frações obtidos de oito espécies de *Aspidosperma* de ocorrência natural na região amazônica: *A. vargasii*, *A. marcgravianum*, *A. sandwithianum*, *A. nitidum*, *A. spruceanum*, *A. araracanga* e *A. schultesii*. Estas espécies foram trabalhadas pela doutora Marycleuma C. Henrique durante sua dissertação de mestrado (HENRIQUE 2007). Foram produzidos extratos metanólicos e aquosos das cascas das plantas, com base no uso popular. Na tentativa de se isolar alcalóides, extratos etanólicos alcalinos (EtOH/NH<sub>4</sub>OH 1%) foram fracionados em um gradiente de pH (8 a 12) com frações finais aquosas e de acetato de etila. Estes extratos e frações foram testados *in vitro* frente à cepa cloroquino-resistente W2 de *P. falciparum* pelo método de incorporação da [<sup>3</sup>H]-hipoxantina (ANDRADE-NETO et al. 2004). Os resultados estão apresentados na tabela 4.

A *A. desmanthum* e *A. vargasii* foram as espécies cujas frações apresentaram maior atividade (4 muito ativas de cada espécie) com CI<sub>50</sub>s variando entre 0,18 a 0,44 µg/mL, valor desejável para uma substância isolada, mas aqui tratam-se de misturas complexas. A atividade antimalárica destas frações era esperada uma vez que seus princípios ativos já foram isolados e testados *in vitro* pelo LAPAAM frente o *P. falciparum* em estudos anteriores (ANDRADE-NETO et al. 2007). Das cascas de *A. vargasii* e *A. desmanthum* foram isolados respectivamente os alcalóides indólicos elipticina (CI<sub>50</sub> = 0,18 µg/mL) e aspidocarpina (CI<sub>50</sub> = 0,18 µg/mL) com potente atividade frente à cepa K1 de *P. falciparum* (ANDRADE-NETO et al. 2007; ROCHA-E-SILVA et al. 2012).

Henrique (2007) identificou por métodos cromatográficos estes alcalóides nos extratos e frações destas espécies que aqui foram considerados ativos. É importante notar que soluções aquosas de *A. desmanthum* são utilizadas pela população e apresentam-se inativas aqui, provavelmente por que o princípio ativo (elipticina) está muito diluído e pouco extraído por este método, visto que a substância é altamente apolar (HENRIQUE et al. 2010).

**Tabela 4: Atividade antimalárica *in vitro* de extratos e frações das cascas de oito espécies de *Aspidosperma* da Amazônia frente à cepa W2 de *P. falciparum*.**

Espécie Vegetal	N.	Ex/Fr <sup>a</sup>	Solvente	Cl <sub>50</sub> [µg/mL]	Classificação da atividade <sup>b</sup>
<i>A. araracanga</i>	35	Ex	MeOH	16,7	PA
	36	Ex	H <sub>2</sub> O	> 50,0	I
	37	Fr	CHCl <sub>3</sub>	37,6	PA
<i>A. desmanthum</i>	38	Ex	MeOH	19,0	PA
	39	Ex	H <sub>2</sub> O	> 50,0	I
	40	Fr	AcOEt	0,20	MA
	41	Fr	H <sub>2</sub> O	> 50,0	I
	42	Fr	CHCl <sub>3</sub>	0,44	MA
	43	Fr	CHCl <sub>3</sub>	0,18	MA
	44	Fr	CHCl <sub>3</sub>	0,27	MA
<i>A. marcgravianum</i>	45	Ex	MeOH	0,30	MA
	46	Ex	H <sub>2</sub> O	>50	I
	47	Fr	CHCl <sub>3</sub>	38,5	PA
	48	Fr	CHCl <sub>3</sub>	15,7	PA
<i>A. nitidum</i>	49	Ex	MeOH	3,21	A
	50	Ex	H <sub>2</sub> O	0,20	MA
<i>A. sandwithianum</i>	51	Ex	MeOH	20,05	PA
	52	Ex	H <sub>2</sub> O	> 50,0	I
	53	Fr	CHCl <sub>3</sub>	28,4	PA
	54	Fr	CHCl <sub>3</sub>	5,8	A
	55	Fr	CHCl <sub>3</sub>	18,9	PA
<i>A. schultesii</i>	56	Ex	MeOH	23,5	PA
	57	Ex	H <sub>2</sub> O	> 50,0	I
	58	Fr	CHCl <sub>3</sub>	17,5	PA
	59	Fr	CHCl <sub>3</sub>	37,2	PA
<i>A. spruceanum</i>	60	Ex	MeOH	10,6	PA
	61	Ex	H <sub>2</sub> O	> 50,0	I
	62	Fr	CHCl <sub>3</sub>	26,7	PA
	63	Fr	CHCl <sub>3</sub>	11,9	PA
<i>A. vargasii</i>	64	Ex	MeOH	4,38	A
	65	Ex	H <sub>2</sub> O	0,24	MA
	66	Fr	AcOEt	0,14	MA
	67	Fr	H <sub>2</sub> O	8,81	A
	68	Fr	CHCl <sub>3</sub>	0,20	MA
	69	Fr	CHCl <sub>3</sub>	0,20	MA
	70	Fr	CHCl <sub>3</sub>	0,21	MA

<sup>a</sup>Natureza da amostra: Ex = Extrato, Fr = Fracção.

<sup>b</sup>Classificação da Atividade baseado na Cl<sub>50</sub>: MA = muito ativo (< 1,0 µg/mL), A = ativo (entre 10 e 1,0 µg/mL), PA = parcialmente ativo (entre 10,0 e 50,0 µg/mL) e I = inativo (>50,0 µg/mL).

Coutinho et al. (2013) recentemente avaliaram a atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* de extratos da casca, folhas e galhos de *A. nitidum*. Os extratos metanólicos e etanólicos das cascas foram considerados ativos ( $CI_{50}$  = 7,0-12,4  $\mu\text{g/mL}$ , cepa W2), enquanto os extratos das folhas e galhos não apresentaram atividades. Frações ricas em alcalóides com boa atividade *in vitro* frente o *P. falciparum* também se mostraram ativas *in vivo* frente o *P. berghei*. Nos testes aqui realizados, o extrato metanólico de *A. nitidum* se mostrou ativo ( $CI_{50}$  = 3,21  $\mu\text{g/mL}$ ) e o extrato aquoso se mostrou muito ativo ( $CI_{50}$  = 0,20  $\mu\text{g/mL}$ ), em acordo com os dados da literatura. Até o momento nenhum alcalóide isolado de *A. nitidum* teve seus dados antimaláricos publicados.

Outra espécie que apresentou extrato metanólico muito ativo foi *A. marcgravianum* com  $CI_{50}$  = 0,30  $\mu\text{g/mL}$ . Estudos químicos e antimaláricos desta espécie são escassos (HENRIQUE 2007). Os extratos e frações das espécies *A. spruceanum*, *A. araracanga* e *A. schultesii* mostraram-se inativos ou parcialmente ativos. Dolabela et al., (2012) testaram *in vitro* frente às cepas W2(CQR) e 3D7(CQS) de *P. falciparum* extratos de seis espécies de *Aspidosperma* de ocorrência no estado de Minas Gerais (*A. cylindrocarpon*, *A. parvifolium*, *A. olivaceum*, *A. ramiflorum*, *A. spruceanum* e *A. tomentosum*), e no estudo todos os extratos foram considerados ativos ( $CI_{50}$  entre 5,0 e 65,0  $\mu\text{g/mL}$ ). O perfil cromatográfico destes extratos revelou altas concentrações de alcalóides.

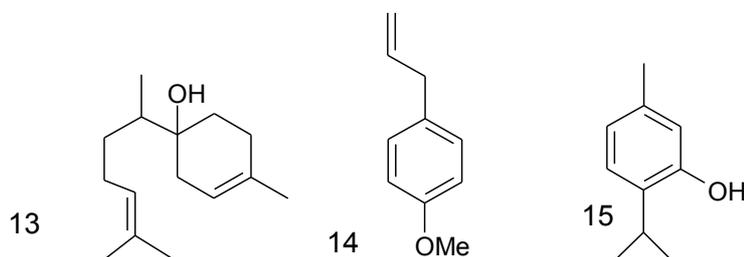
Nossos resultados juntamente com os dados da literatura discutida confirmam a atividade antiplasmodial *in vitro* de espécies de *Aspidosperma* usadas no tratamento da malária no Brasil, e encorajam a continuação de pesquisas fitoquímicas e farmacológicas nestas espécies.

### **1.3.1.3 Óleos essenciais (OE) de plantas nordestinas e seus compostos majoritários**

O Nordeste do Brasil tem uma grande biodiversidade de plantas medicinais, e um conhecimento etnobotânico riquíssimo. No entanto estudos de atividade antimalárica das plantas desta região são relativamente

desconhecidos. Na busca de possíveis novas substâncias ativas para malária, nos propomos avaliar a atividade antimalárica *in vitro* dos óleos essenciais de três espécies vegetais da flora nordestina e seus compostos majoritários  $\alpha$ -bisobolol, estragol e timol (figura 7). Os óleos essenciais e os compostos foram estudados quimicamente pela aluna de pós-graduação Magaly Mota, e seu orientador Dr. Valter Andrade Neto (UFRN) um importante colaborador deste projeto. Os resultados estão apresentados na tabela 5.

*Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae), *Lippia sidoides* (Verbenaceae), e *Croton zehntneri* (Euphorbiaceae) são plantas abundantes na região da caatinga do estado do Ceará no nordeste brasileiro, onde são popularmente utilizadas para ação anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana e para o tratamento de distúrbios gástricos. As substâncias majoritárias presentes nos óleos essenciais destas espécies são terpenos e sesquiterpenos, fenilpropanóides classes químicas cujos compostos são responsáveis pela atividade antimalárica em muitas plantas, incluindo algumas plantas amazônicas estudadas neste capítulo (MOTA et al. 2012).



**Figura 7: Substâncias majoritárias presentes nos óleos essenciais de plantas nordestinas:  $\alpha$ -bisobolol (13; *V. arborea*), estragol (14; *L. sidoides*) e timol (15; *C. zehntneri*).**

Os óleos essenciais de *V. arborea*, *L. sidoides* e *C. zehntneri* apresentaram significativa atividade frente a *P. falciparum* (tabela 5), enquanto seus componentes majoritários apresentaram baixa atividade ( $> 20,0 \mu\text{M}$  para substâncias puras). Quando comparamos as  $\text{CI}_{50}$ s em  $\mu\text{g/mL}$ , é possível notar que a atividade antimalárica dos óleos essenciais de *V. arborea* e *L. sidoides* foi muito semelhante à de seus compostos majoritários puros, respectivamente  $\alpha$ -bisobolol (80,4% m/m no óleo essencial) e Timol (84,9% m/m no óleo

essencial). Desta forma é possível inferir que a atividade antimalárica dos óleos essenciais pode ser atribuída a seus compostos majoritários. As amostras de *C. zehntneri* foram às que apresentaram menor atividade. Mota et al.(2012) demonstrou que estes compostos possuem baixa toxicidade e atividade antimalárica *in vivo* moderada.

**Tabela 5. Atividade antimalárica *in vitro* de óleos (OE) essenciais e compostos majoritários dos OE frente à cepa K1 de *P. falciparum*.**

Espécie Vegetal	OE/Componente majoritário	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	CI <sub>50</sub> (µM)	Classificação Atividade
<i>C. zehntneri</i>	OE	15.20	-	A
	Estragol (14, fenil propanóide)	30.70	207,5	I
<i>L. sidoides</i>	OE	10.50	-	PA
	Timol (15, terpeno)	4.50	30,2	I
<i>V. arbórea</i>	OE	7.00	-	A
	α-bisabolol (13, terpeno)	5.00	22,4	I

A = ativo, PA = parcialmente ativo; I = inativo

Os óleos essenciais contém importantes classes de componentes químicos naturais que historicamente apresentam atividade antimalárica como monoterpenos, sesquiterpenos e fenil propanóides (SCHMIDT et al. 2012; SCHMIDT et al. 2012). Rodrigues-Goulart et al., (2004) demonstrou que os compostos terpênicos farnesol, nerolidol, limoneno e linalol, cujas estruturas são semelhantes aos compostos majoritários aqui reportados, apresentaram boa inibição *in vitro* frente o *P. falciparum* e inibiram a biossíntese de alguns metabólitos da via de isoprenóides no mesmo parasito. Esta é a primeira vez que é reportada a atividade antimalárica de óleos essenciais de *V. arbórea*, *L. sidoides* e *C. zehntneri*, e seus resultados foram publicados em Mota et al. (2012).

### 1.3.2 Atividade antimalárica *in vitro* de substâncias naturais e seus análogos sintéticos e semi-sintéticos

Ao longo de décadas, diversos grupos de pesquisa no Brasil tem estudado química e farmacologicamente centenas de extratos de plantas popularmente utilizadas para tratar malária, e muitos destes estudos não avançaram na identificação dos princípios ativos responsáveis pelas atividades (AGUIAR et al. 2012; BRANDAO et al. 1992; BRANDAO et al. 1997; CARVALHO et al. 1991; POHLIT et al. 2013). Entretanto com o avanço e a disponibilidade de tecnologias para se isolar, purificar, caracterizar e elucidar estruturas, nos últimos anos vários compostos isolados de plantas tem sido testados frente o *P. falciparum in vitro* (CRUZ et al. 2013; POHLIT et al. 2013).

Através de técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas dos tipos *time of flight* e *ion trap* (LC-TOF-MS e LC-IT-MS, respectivamente) e ressonância magnética nuclear (RMN), integrantes do LAPAAM/INPA, purificaram e caracterizaram as substâncias aqui testadas, às quais pertencem às classes químicas: alcalóides indólicos, fenil/propanóides ou limonóides. As concentrações inibitórias 50% (CI<sub>50</sub>) das substâncias naturais estudadas e seus análogos sintéticos e derivados semi-sintéticos estão apresentadas na tabela 6 onde as substâncias estão organizadas por classe química. Os critérios de atividade para substâncias puras foram os convencionados na literatura (ANDRADE-NETO et al. 2004; FLANNERY et al. 2013; KRETTLI et al. 2009; SANTOS-TORRES et al. 2013).

#### CI<sub>50</sub> para substâncias puras:

- Maior que 20 µM = inativo
- Entre 20,0 µM e 5,0µM = atividade moderada
- Entre 5,0µM e 0,1µM = ativo
- Menor que 0,1µM = muito ativo

**Tabela 6: Concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) de substâncias naturais presentes em plantas amazônicas e seus derivados semi-sintéticos frente às cepas K1 e 3D7 de *P. falciparum*.**

Nome	N.	Natureza <sup>a</sup>	Espécie Vegetal	CI <sub>50</sub> [μM]	
				K1	3D7
<b>Alcalóides Indólicos</b>					
elipticina	9	PN	<i>Aspidosperma vargasii</i>	0,81	0,35
20- <i>epi</i> -dasicarpidona	16	PN	<i>A. ulei</i>	16,7	NT
12-hidroxi- <i>N</i> -acetil-21( <i>N</i> )-deidroplumeranoico	17	PN	<i>A. ulei</i>	>100	NT
19( <i>E</i> )-hunteracina	18	PN	<i>A. ulei</i>	>100	NT
20( <i>E</i> )- <i>nor</i> -subincanadina E	19	PN	<i>A. ulei</i>	54,3	NT
olivacina	10	PN	<i>A. olivaceum</i> / <i>A. ulei</i>	1,4	1,2
3,4,5,6-tetradesidro-β-ioimbina	20	PN	<i>A. ulei</i>	39,9	NT
<b>Fenil/Propanóides</b>					
2- <i>O</i> -benzil 4-nerolidilcatecol	4	DS		7,05	5,94
1,2- <i>O</i> , <i>O</i> -diacetil 4-nerolidilcatecol	12	DS		4,85	5,57
1,2- <i>O</i> , <i>O</i> -dibenzoil 4-nerolidilcatecol	5	DS	<i>Piper peltatum</i>	28,73	38,07
4-nerolidilcatecol	1	PN		0,68	2,11
<b>Limonóides</b>					
6α-acetoxiazadiradiona	21	PN		15,4	NT
6α-acetoxigedunina	23	PN		7,0	NT
Andirobina	22	PN	<i>Carapa guianense</i>	15,3	NT
7-deacetil-7-oxogedunina	24	PN		20,7	NT
6α-hidroxideacetilgedunina	25	DS		5,0	NT
Cloroquina (Difosfato)		Controle		0,13	0,058
Quinina (Sulfato)		Controle		0,16	0,11
Artemisinina		PN	<i>Artemisia annua</i>	0,002	0,001

\*Natureza da amostra: PN=Produto Natural, DS=Derivado semi-sintético, S=Substância Sintética; NT=Não testado.

Os alcaloides indólicos elipticina (**9**), olivacina (**10**), triflato de criptolepina (**11a**), análogo de criptolepina (**11b**) foram ensaiados para atividade antimalárica *in vitro* frente às cepas K1 (cloroquina resistente) e 3D7 (cloroquina sensível) de *P. falciparum*. Os resultados do teste *in vitro* estão apresentados na tabela 6. Olivacina (**10**) é um alcaloide indólico pouco conhecido para o qual não há relatos na literatura de atividade antimalárica. Este composto foi o menos ativo dos alcaloides análogos da elipticina, entretanto ainda expressou significativa atividade antimalárica ( $CI_{50} = 1,2 \mu\text{M}$  frente à cepa 3D7).

A potente atividade *in vitro* de elipticina (**9**) reportada previamente foi confirmada aqui (valores de  $CI_{50}$  de 0,31 e 0,35  $\mu\text{M}$  frente às cepas K1 e 3D7 respectivamente). Esta atividade antimalárica de **9** frente o *P. falciparum* foi descrita pela primeira vez pelo LAPAAM no trabalho de Andrade-Neto et al., (2007) ( $CI_{50} = 73 \text{ nM}$  frente a cepa K1) e foi recentemente confirmada em trabalho independente frente a cepa cloroquino-resistente FcM29-Cameroon ( $CI_{50} = 1,13 \mu\text{M}$ ) (PASSEMAR et al. 2011; POHLIT et al. 2012).

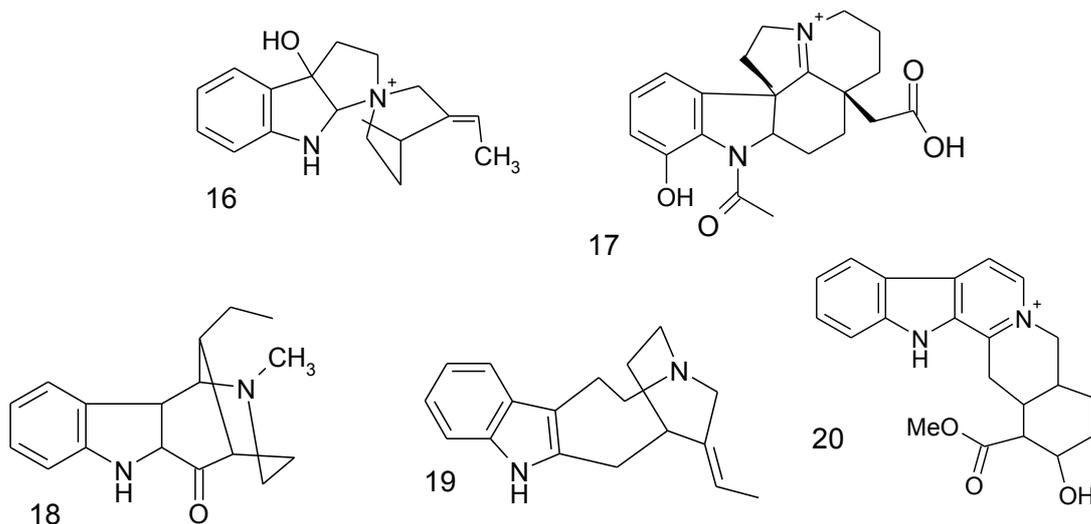
Os compostos sintéticos triflato de criptolepina (**11a**) e seu análogo **11b** (figura 5) também foram testados aqui frente às cepas K1 e 3D7 *in vitro*. Criptolepina é um alcalóide indólico encontrado na planta trepadeira *Cryptolepis sanguinolenta*, utilizada no este africano para tratamento de malária, e tem sido bem estudada como potencial *lead* para novos antimaláricos (WRIGHT 2005; WRIGHT et al. 2001). **11a** exibiu um valor de  $CI_{50}$  de 0,8 e 0,9  $\mu\text{M}$  frente às cepas K1 e 3D7 de *P. falciparum* respectivamente. Estes resultados concordam com dados da literatura reportados para **11a** frente K1 (CIMANGA et al. 1997; WRIGHT et al. 2001) e 3D7 (LAVRADO et al. 2011).

Lavrado et al. (2008) sintetizaram análogos de **11a** contendo cadeias laterais diamino-alcálicas na posição C-11. A base para esta abordagem foi a observação de que a cadeia alcalina amino-lateral é requerida para acumulação de cloroquina no vacúolo digestivo do parasito. Desta forma análogos de **11a** foram potentes inibidores de *P. falciparum in vitro* ( $CI_{50} = 20-445 \text{ nM}$ ). **11b**, a melhor molécula dos estudos de Lavrado (LAVRADO et al. 2011; LAVRADO et al. 2008), foi selecionada para o atual

estudo comparativo, e apresentou a maior atividade com  $CI_{50}$  de 0,087  $\mu\text{M}$  para a cepa 3D7 e 0,1  $\mu\text{M}$  para K1.

As substâncias **9**, **10**, **11a** e **11b** (figura 5) também foram testadas para atividade citotóxica em macrófagos murinos *in vitro* conforme apresentados em Rocha-e-Silva et al. (2012), onde **9** e **10** apresentaram baixa citotoxicidade com altos índices de seletividade ( $>300$ ) e **11a** e **11b** apresentaram  $CI_{50}$  frente os macrófagos de 9,1 e 34  $\mu\text{M}$  respectivamente. É importante notar que o esqueleto carbônico indólico planar de 4 anéis que forma a estrutura básica das substâncias **9-11b** apresenta grande atividade antimalárica e pode ser otimizado para o desenvolvimento de novas drogas. **9** e **10** tem uma metila a mais ligada aos anéis da estrutura em relação à **11a** e **11b**, o que aparentemente tem influenciando na diminuição da citotoxicidade destas substâncias. A atividade antiplasmódica destes compostos está diretamente relacionada com a inibição da formação de hemozoína, conforme será discutido no capítulo 3. Os resultados obtidos com os alcalóides indólicos análogos da elipticina foram publicados em Rocha-e-Silva et al. (2012).

Os demais alcalóides testados (**16-20**) (figura 8), foram isolados de diferentes partes de *A. ulei*, durante a tese de doutorado da Dra. Zelina Santos Torres (2012). No referido trabalho foram isoladas e identificadas 12 substâncias, sendo uma delas (**17**) inédita. Para cinco destas substâncias já haviam dados antimaláricos na literatura (SANTOS-TORRES et al. 2013), duas substâncias não foram isoladas em quantidade suficiente para testes, e os cinco alcalóides restantes (**16-20**) foram testados pela primeira vez aqui. Os compostos **17**, **18**, **19** e **20** foram inativos, e o composto 20-*epi*-dasicarpidona (**16**) apresentou atividade moderada com  $CI_{50} = 16,7 \mu\text{M}$ . Estes resultados foram publicados em Torres et. al. (2013).



**Figura 8. Estrutura dos alcalóides indólicos isolados de *A. ulei*: 20-epidasicarpidona (16), Ác. 12-hidroxi-N-acetil-21(N)-desidroplumerano-18-óico (17), 19E-hunteracina (18), 20(E)-16,17-nor-subincanadina E (19) e 3,4,5,6-tetradesidro-β-ioimbina (20).**

O 4-nerolidilcatecol (**1**) e seus derivados **4**, **5** e **12** exibiram uma importante atividade inibitória *in vitro* frente a ambas as cepas de *P. falciparum* testadas. Os resultados estão apresentados na tabela 6. A  $Cl_{50}$  de **1** e dos derivados **4** e **5** frente à cepa multi-resistente K1 deste trabalho está compatível com resultados anteriormente publicados pelo LAPAAM (ANDRADE-NETO et al. 2007; PINTO et al. 2009). Frente à cepa 3D7 é a primeira vez que estes compostos são testados, assim como é inédita a atividade antimalárica de O,O-diacetil-4-nerolidilcatecol (**12**) ( $Cl_{50}$  = 4.85/5.57  $\mu$ M cepas K1/3D7). A facilidade na síntese e purificação de **12** também torna esta molécula interessante para estudos farmacológicos que requerem maior quantidade de substância, como testes *in vivo*. Este composto foi evidenciado na literatura pela primeira vez na década de 80 com o objetivo de caracterizar a estrutura de **1**, porém nunca havia sido testado para malária (KIJJOA et al. 1980). Os compostos foram retestados *in vitro* para orientar os estudos posteriores *in vivo* e de inibição metabólica descritos respectivamente nos capítulos 2 e 3.

Os limonóides **21-24** isolados de *C. guianense* e o limonóide semi-sintético **25** foram testados frente à cepa K1 de *P. falciparum*. As concentrações inibitórias médias dos limonóides estão apresentadas na tabela 6, e as estruturas moleculares representadas na figura 9. As  $Cl_{50}$  dessas cinco

substâncias foram entre 5,0-20,7  $\mu\text{M}$ . O derivado semi-sintético **25** produzido por desacetilação de **23** foi a substância que apresentou melhor atividade com um  $\text{CI}_{50}$  de 5,0  $\mu\text{M}$ . **25** é uma substância inédita preparada por e foi preparada por Pereira (2013) no desenvolvimento de seu mestrado.

Gedunina (**26**) é um importante representante da classe dos limonóides e está presente em várias partes de *C. guianenses*. Estudos anteriores revelaram uma boa atividade antimalárica *in vitro* ( $\text{IC}_{50} = 0.40 - 2.5 \mu\text{M}$ ) de **26** frente a várias linhagens de *P. falciparum* (JITTANIYOM et al., 2012; HOFER et al., 2009). O limonóides **23** e **24** são derivados naturais de **26** e apresentaram atividade muito semelhantes entre si, e com valores de  $\text{CI}_{50}$  maiores que os reportado para **26** na literatura mencionada. Nosso dados mostram que **21** apresentou a metade da atividade de **23**, concordando com trabalho de Jittaniyom et al. (2012) e indicando que a atividade antimalárica *in vitro* é influenciada por mudanças estruturais no anel D.

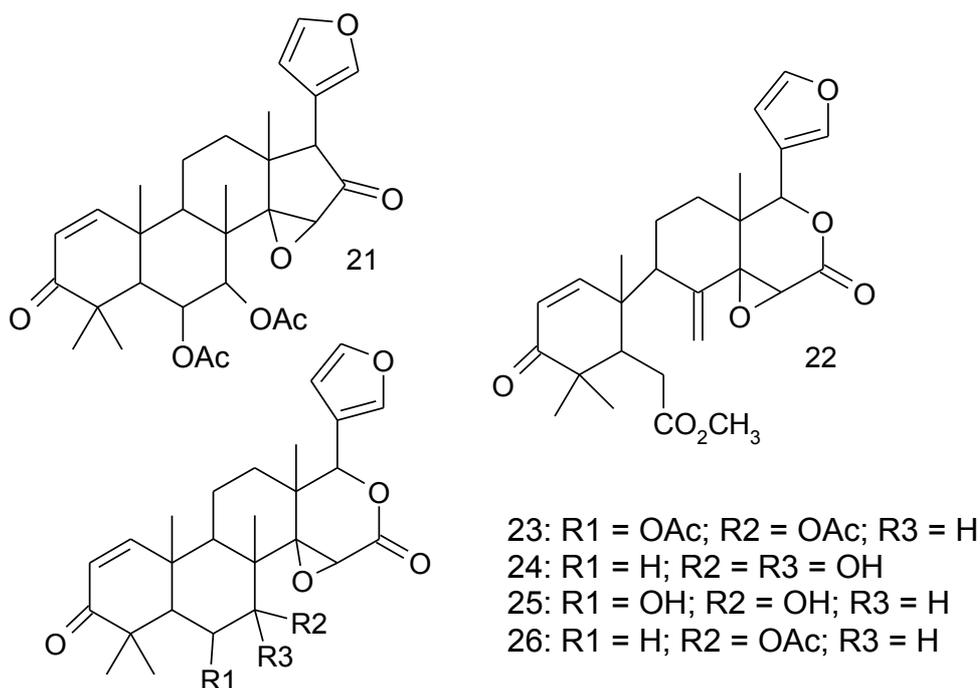


Figura 9: Limonóides isolados de *C. guianensis*: 6 $\alpha$ -acetoxiazadiradiona (**21**), andirobina (**22**), 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (**23**) e 7-deacetil-7-oxogedunina (**24**), o derivado semi-sintético 6 $\alpha$ -hidroxydeacetylgedunina (**25**) e gedunina (**26**).

### 1.3.3 Endoperóxidos sintéticos

A abordagem principal desta tese é a descoberta e desenvolvimento de novos antimaláricos a partir de substâncias isoladas de plantas, seguindo o sucesso histórico das drogas antimaláricas atuais. Neste contexto o grupo de pesquisas do prof. Dr. Marcelo Siqueira Vale do Departamento de Ciências Naturais da Universidade Federal de São João del Rei (MG) sintetizou 15 substâncias baseadas na estrutura de dois produtos naturais com significativa atividade antimalárica: a curcumina e a artemisinina (KAUR et al. 2009). Destas, 9 di-hidroperóxidos e tetraoxanos (ao grupo farmacóforo peróxido é atribuída a atividade da artemisinina) conjugados com derivados di-benzil-acetona (estrutura básica da curcumina isolada de *Curcuma longa*) foram testadas frente à cepa K1 de *P. falciparum*. A estrutura química da curcumina e dos endoperóxidos testados aqui estão apresentadas na figura 10.

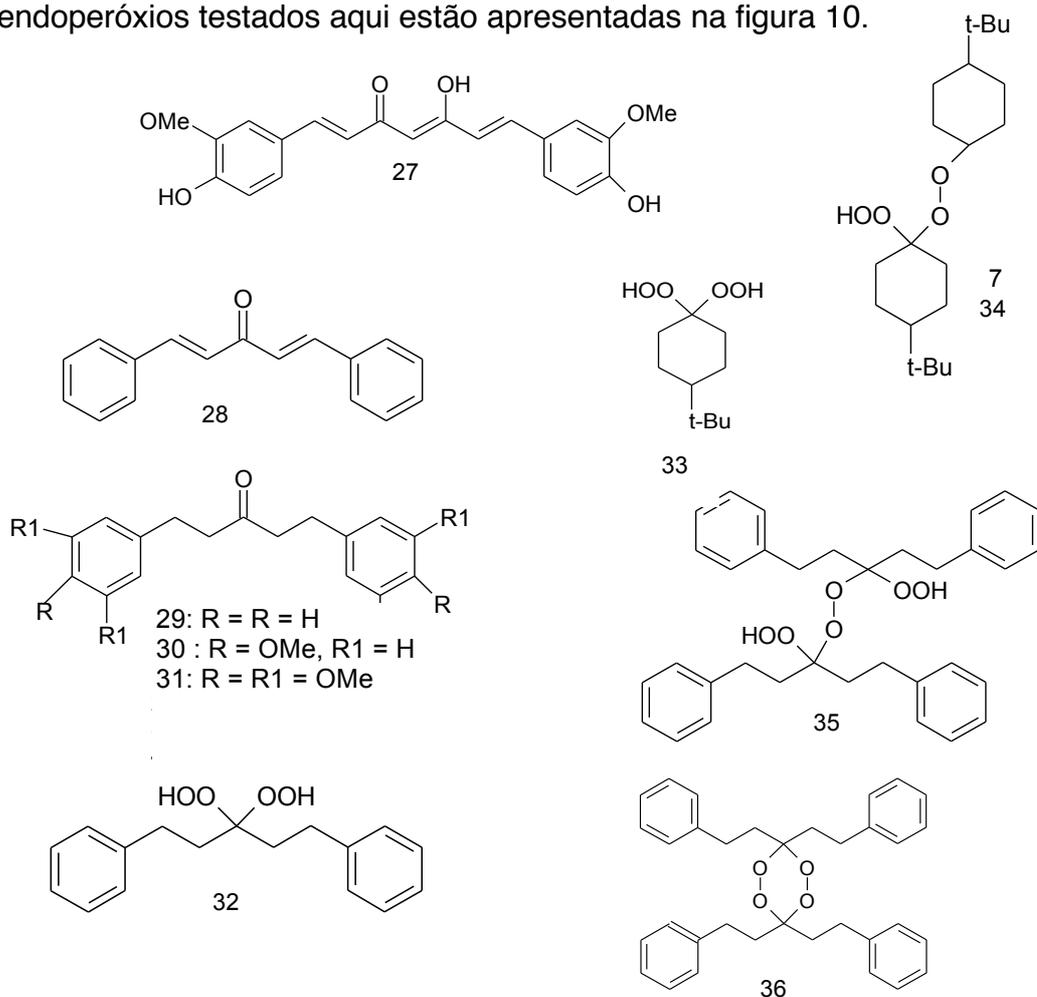


Figura 10: Estrutura da curcumina (27) e endoperóxidos sintéticos 28-36.

Os resultados da atividade antimalárica *in vitro* dos endoperóxidos estão apresentados na tabela 7. A descrição das sínteses e os demais dados químicos destes compostos foram publicados em Franco et al. (2012). Muitos compostos que possuem o grupo funcional endoperóxido (R–O–O–R) exibem atividade antimalárica, a exemplo do composto natural artemisinina e seus derivados semi-sintéticos. Endoperóxidos e tetraoxanos apresentam uma grande variedade de atividades biológicas dado o seu potencial oxidativo (FRANCO et al. 2012). Os compostos **32**, **35** e **36** da tabela 7 foram os endoperóxidos sintéticos que apresentaram melhor atividade com  $CI_{50}$  variando de 1,4 a 3,3  $\mu$ M. Os demais foram considerados inativos. Todos os compostos ativos apresentavam a ponte O-O- que foi importante para suas atividades antimaláricas.

**Tabela 7: Atividade antimalárica *in vitro* de endoperóxidos e tetraoxanos sintéticos frente a cepa K1 de *P. falciparum*.**

Nome	N.	K1
		$CI_{50}$ [ $\mu$ M]
1,5-Di(fenil)-penta-1,4-dien-3-ona	28	32,0
1,5-Di(fenil)pentan-3-ona	29	66,0
1,5-Di(4-metoxifenil)pentan-3-ona	30	42,0
1,5-Di(3,4,5-trimetoxifenil)pentan-3-ona	31	110
3,3-Dihidroperoxi-1,5-(difenil)pentano	32	1,4
4-terc-Butil-1,1-dihidroperoxiciclohexane	33	64,0
1,1-Peroxidi(4-terc-butil(hidroperoxi) ciclohexano)	34	31,0
[3,3-Peroxi-di-(3-hidroperoxipentano-5,3,1-tril)]tetrabenzeno-	35	3,3
3,3,6,6-Tetrafenetil-1,2,4,5-tetraoxano	36	1,6

#### 1.3.4 Susceptibilidade de isolados de campo de *P. vivax* a produtos naturais

O cultivo contínuo de *P. vivax* tem se apresentado como um grande desafio para pesquisadores de malária em todo o mundo e parece uma realidade ainda distante. O desenvolvimento de tecnologias como a do DELI-

test (*double-site enzyme linked LDH imunodetection*) trouxeram novas perspectivas para o estudo da malária causada pelo *P. vivax* predominante na nossa região, contudo *screenings* em larga escala para testes de bibliotecas de compostos com *P. vivax* ainda não são possíveis (POHLIT et al. 2013).

Para o atual estudo selecionou-se duas moléculas naturais (elipitina e neosergeolida) e um derivado semi-sintético (1,2-O,O-diacetil 4-nerolidlcatecol) para serem testados frente a isolados de campo de *P. vivax*. Além dos compostos de origem natural, os mesmos parasitos também foram testados frente às drogas cloroquina, mefloquina e diidroartemisinina que fazem parte do arsenal terapêutico contra o *P. vivax*.

A técnica utilizada foi a do DELI-Test descrita por Druilhe et al. (2007), adaptada por Chehuan et al. (2013). Foi utilizado sangue infectado de 18 pacientes coletado após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os resultados de 6 (40%) amostras foram inconclusivos e considerados como perda. A tabela 8 apresenta a média das  $CI_{50}$  de 12 isolados de campo de *P. vivax* frente aos produtos naturais e às drogas padrão.

**Tabela 8: Média das concentrações inibitórias 50% ( $CI_{50}$ ) de doze isolados de campo de *P. vivax* frente a drogas padrão, produtos naturais e derivado semi-sintético.**

Nome do composto	Média dos $CI_{50} \pm DP$ [ $\mu M$ ]
Cloroquina (difosfato)	0,07 $\pm$ 0,02
Mefloquina	0,013 $\pm$ 0,005
Dihidroartemisinina	0,002 $\pm$ 0,001
1,2-O,O-diacetil 4-nerolidlcatecol	9,0 $\pm$ 2,2
Elipitina	4,7 $\pm$ 1,2
Neosergeolida	0,010 $\pm$ 0,002

DP= Desvio Padrão

A utilização de isolados de campo em estudos de atividade antimalárica *in vitro* permite a avaliação real do perfil de susceptibilidade, dos parasitos circulantes em determinadas regiões, à drogas tradicionais e a produtos naturais. Estes estudos normalmente são acompanhados de resultados obtidos com cepas padrão cujo perfil de sensibilidade é estavelmente pré-estabelecido, sendo um importante fator de validação do método (ROCHA-E-SILVA et al. 2012). Na inexistência de cepas padrão de *P. vivax*, é importante relacionar os resultados encontrados com dados da literatura. O *cut-off* de  $CI_{50}$  para sensibilidade às drogas tradicionais utilizado ainda é o estabelecido para o *P. falciparum* (cloroquina 100 nM e mefloquina 30 nM) (WHO 2007).

Todos os isolados de campo de *P. vivax* foram considerados sensíveis às drogas estudadas. Ao se determinar as  $CI_{50}$  dos isolados de campo às drogas cloroquina, mefloquina e diidroartemisinina objetivou-se não monitorar a resistência local do *P. vivax*, mas conhecer o perfil de sensibilidade destes isolados de campo frente os antimaláricos tradicionais, uma vez que estavam sendo testados frente aos produtos naturais. Considerando-se o número reduzido de amostras de *P. vivax*, os resultados aqui alcançados são comparáveis aos estudos de Chehuan et al. (2013) na região amazônica que encontrou 12 isolados de campo de *P. vivax* resistentes a cloroquina ( $CI_{50} > 100$  nM) em 112 amostras pesquisadas e considerou 3 amostras resistentes a mefloquina em 47 isolados testados. A perda de amostras do referido estudo no que se refere a testes válidos foi estimada em 50%. São considerados como perda testes nos quais os poços controles não se encontram parasitos após as 48 h de incubação, ou testes que as leituras de DO não resultaram em curvas de concentração respostas.

Os isolados de campo apresentaram alto grau de susceptibilidade aos produtos naturais testados, sendo neosergeolida o composto mais ativo ( $CI_{50} = 0,010 \mu M$ ). Aparentemente os isolados de campo de *P. vivax* foram pouco menos sensíveis que as cepas de *P. falciparum* previamente estudadas para os mesmos compostos (ver tabela 8), fato que foi mais acentuado para elipticina. Alguns estudos mostram que o *P. vivax* apresenta perfil de sensibilidade diferente do *P. falciparum* também às drogas tradicionais. Tem

sido sugerido, por exemplo, que o *P. vivax* é intrinsecamente resistente aos antifolatos (YOUNG e BURGESS 1959) e Russell et al. (2008) demonstraram que trofozoítas de *P. vivax* são consideravelmente mais resistentes à cloroquina que trofozoítas de *P. falciparum* no teste de maturação *in vitro*. Estes fatos mostram que a extrapolação dos resultados do *P. falciparum* para o *P. vivax* deve ser analisada com a devida atenção.

Os resultados aqui apresentados são preliminares, pois a metodologia ainda está sendo padronizada para *P. vivax*, havendo necessidade de algumas alterações no protocolo original e de realização de testes com um número maior de isolados de campo e substâncias naturais.

## 1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS DO CAPÍTULO

A implementação do teste antimalárico *in vitro* em Manaus representa um importante avanço científico para este grupo de pesquisa e para toda a região. O teste *in vitro* baseado na microscopia limitou o número de amostras testadas, embora mais de cem amostras entre extratos, frações e substâncias tenham sido ensaiadas no total.

A avaliação da atividade antimalárica *in vitro* das amostras confirma o uso popular das mesmas. As amostras de *Aspidosperma* e *Picrolema sprucei* foram consideradas as mais ativas entre os extratos e frações estudadas. Os resultados aqui apresentados servem de base para futuros estudos fitoquímicos e de semi-síntese. Os vários extratos ativos aqui identificados devem ter seus princípios ativos isolados pela fitoquímica clássica ou por estudos de afinidade molecular de *high throughput screening* em alvos moleculares do *Plasmodium* através de Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS) no aparelho BIACORE.

A caracterização da atividade *in vitro* dos produtos naturais, compostos sintéticos e semi-sintéticos serviu como ponto de partida para selecionar as amostras mais promissoras para a etapa seguinte do desenvolvimento de novos antimaláricos. Limonóides, 4-nerolidilcatecol e seus derivados e os alcalóides indólicos análgos da elipticina foram os compostos selecionados para o estudo *in vivo* em camundongos infectados com *P. berghei* por apresentarem boa atividade e as quantidades suficientes em massa requeridas para estes testes.

## Capítulo 2

---

**ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VIVO* DE PRODUTOS NATURAIS E SEUS DERIVADOS SEMI-SINTÉTICOS EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Plasmodium berghei*.**

## 2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1.1 Estudo da atividade antimalárica *in vivo*

O modelo da malária animal é a ferramenta chave para a descoberta e desenvolvimento de drogas, pois provê uma avaliação integrada da droga no contexto fisiológico. A eficácia da droga depende dos fatores farmacocinéticos e farmacodinâmicos (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), efeitos toxicológicos provocados no hospedeiro, e o efeito farmacológico antiparasitário intrínseco da droga. A atividade farmacológica e os efeitos farmacocinéticos podem ser substancialmente diferentes entre o modelo animal e os seres humanos, dadas as diferenças entre o tamanho do corpo e as espécies de *Plasmodium* envolvidas. Porém muitas interações farmacológicas entre droga e patógeno são independentes do hospedeiro envolvido. Desta forma o modelo animal permite obter noções das propriedades farmacológicas *in vivo* da droga, e suas combinações (JIMENEZ-DIAZ et al. 2013).

Várias espécies animais são susceptíveis à infecção por *Plasmodium*, porém o camundongo é a espécie animal mais utilizada como hospedeiro e é ideal para testes de descoberta e desenvolvimento de drogas antimaláricas. Isso ocorre principalmente pela sua versatilidade e acessibilidade, pois os camundongos são relativamente fáceis de criar, manter, manusear e são pequenos (20-30 g), o que requer uma pequena quantidade de drogas (KRETTLI et al. 2009).

Há quatro principais espécies de *Plasmodium* que foram extraídas de roedores africanos e adaptadas para crescimento em camundongos de laboratório: *P. berghei*, *P. yoelli*, *P. chabaudi* e *P. vinckei*. Destes o *P. berghei* é o mais amplamente utilizado, sendo os demais utilizados em menor extensão. A escolha da espécie plasmodial é baseada no empirismo pois nem todas as espécies são igualmente susceptíveis a droga. As espécies de *Plasmodium* de roedor tem ciclo eritrocítico de 24 h que é a principal diferença em relação aos parasitas humanos, mas a despeito destas diferenças os parasitas da malária de roedor podem reproduzir o ciclo completo da doença

(NOGUEIRA e ROSÁRIO 2010). A tabela 9 apresenta as principais diferenças entre as espécies de *Plasmodium* de roedor e humanos.

**Tabela 9: Diferenças entre as espécies de *Plasmodium berghei*, *P. falciparum* e *P. vivax* utilizadas no estudo de novas drogas.**

Característica	<i>P. berghei</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>
Hospedeiro	Roedor	Humano	Humano/Símios
Modelo experimental	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> (cultura limitada)
Duração do ciclo pré-eritrocítico	48-52 h	6-10 dias	7-15 dias
Duração do ciclo sanguíneo assexuado	22-24 h	48 h	48 h
Merozoítas por esquizontes	12-18	16-32	16-32
Infecção sanguínea sincrônica	Não	Sim	Não
Célula hospedeira	Reticulócitos	Eritrócitos maduros	Reticulócitos

Adaptado (FIDOCK et al. 2004; KRETTLI et al. 2009; NOGUEIRA e ROSÁRIO 2010)

Entre as linhagens de camundongos albinos mais utilizadas na terapêutica experimental estão os Webster suíços e BALB/c, que na maioria das vezes são escolhidos de acordo com disponibilidade de espécie do biotério onde os testes são realizados. Linhagens isogênicas (*inbred*) de camundongos BALB/c são susceptíveis à infecção por *P. berghei* e apresentam respostas mais uniformes em estudos farmacológicos. Camundongos BALB/c tem sido utilizados em diversos trabalhos de atividade antimalárica *in vivo* (DUA et al. 2013; JORDAO et al. 2011) e foram as espécies utilizadas nos estudos que

identificaram os candidatos à droga MK-4815, NITD609 e OZ439 que já estão em fase clínica II de desenvolvimento (AGUIAR et al. 2012; JIMENEZ-DIAZ et al. 2013). Os camundongos suíços heterogênicos (*outbred*) são de grande importância para experimentação animal no estudo de novas drogas, pois possuem grande variabilidade gênica, devido aos cruzamentos aleatórios, assim como ocorre com a espécie humana. Esta espécie também tem sido amplamente utilizada em estudos de atividade antimalárica *in vivo* (ANDRADE-NETO et al. 2004; CIMANGA et al. 1997; COUTINHO et al. 2013; JIMENEZ-DIAZ et al. 2013; REZENDE et al. 2013; WRIGHT et al. 2001).

Peters et al. (1965), desenvolveram um dos principais protocolos utilizados para avaliação da atividade antimalárica *in vivo*, conhecido como teste de supressão de Peters de quatro dias. Neste ensaio os camundongos são tratados logo após a infecção por quatro dias, recebendo uma dose por dia da substância teste. Nos dias 5 e 7 após a infecção a parasitemia é avaliada, e após o dia 7 nenhuma intervenção é realizada nos camundongos, observando-se apenas sua sobrevivência. Nestes testes são medidos principalmente (ANDRADE-NETO et al. 2008; KRETTLI et al. 2009; NOGUEIRA e ROSARIO 2010; ROCHA-E-SILVA et al. 2011):

- a) a depuração dos parasitas detectados por meio da microscopia óptica;
- b) o tempo gasto entre a última dose da droga e a depuração da parasitemia;
- c) a dosagem da droga que depura os parasitos como resposta a sua utilização.

Nos testes *in vivo* as drogas geralmente são administradas por mais de uma via de administração, pois todas elas apresentam vantagens e desvantagens, sendo a oral e a subcutânea as mais comuns. Pela via oral é possível perceber o efeito do pH ácido do estômago e do metabolismo de primeira passagem sob a ação dos citocromos p450 no fígado, o que muitas vezes transforma as drogas em metabólitos ativos ou inativos. Pela via subcutânea a absorção das drogas é normalmente mais lenta, o que conseqüentemente afeta sua liberação e manutenção nas concentrações plasmáticas. Esta via também evade o metabolismo de primeira passagem. O modelo experimental antimalárico *in*

*vivo* é normalmente sensível á estas observações (MEISCH 2001; MOTA et al. 2012; ROCHA-E-SILVA et al. 2011). No presente trabalho três grupos de substâncias selecionadas a partir de estudos *in vitro* descritos no capítulo 1 foram testadas para atividade antimalária *in vivo*: o terpeno 4-nerolidilcatecol e dois de seus derivados; dois limonóides naturais; e elipticina e alguns de seus análogos.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios de atividade antimalárica *in vivo* foram realizados inicialmente no Laboratório de Biologia da Malária e Toxoplasmose (LABMAT), do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), sob a coordenação do Prof. Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto, sendo posteriormente adaptado na Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado, com o apoio da Gerência de Malária e Gerência de Ofidismo, e finalmente adaptados no Biotério Central do INPA com o apoio do Laboratório de Malária e Dengue.

### 2.2.1 Substâncias químicas estudadas

Para os testes antimaláricos *in vivo* foram selecionadas substâncias puras que apresentaram boa atividade antimalárica *in vitro* frente a *P. falciparum* (ver item 1.3.2 e tabela 6 do capítulo 1) e estavam disponíveis em quantidade suficiente para o teste (300 a 1000 mg):

- Os alcalóides indólicos elipticina (**9**), olivacina (**10**), triflato de criptolepina (**11a**) e hidrocloreto de 11-(4-piperidinamino) criptolepina (**11b**), obtidos conforme descrito no item 1.2.1 do primeiro capítulo;

- Os limonóides 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (**23**) e 7-deacetil-7-oxogedunina (**24**) obtidos conforme descrito no item 1.2.1 do primeiro capítulo;

- 4-nerolidilcatecol (**1**) e seus dois derivados 1,2-O,O-diacetil 4-nerolidilcatecol (**12**) e 1,2-O,O-dibenzoil 4-nerolidilcatecol (**5**) obtidos conforme descrito no item 1.2.1 do primeiro capítulo;

### 2.2.2 Animais de experimentação e aspectos éticos

Foram utilizadas fêmeas de camundongos albinos Webster Suíços e BALB/c com peso médio  $23 \pm 3$ g e 6 a 8 semanas de idade. Os animais receberam água e alimento *ad libitum*. O protocolo de testes *in vivo* foi aprovado pelos Comitês de Ética no Uso de Animais do INPA (CEUA 062/2012, anexo 3) e UFRN (CEUA 043/2010).

### 2.2.3 Teste de atividade antimalárica *in vivo* no modelo murino

Foi utilizada no estudo a cepa NK65 do *P. berghei*, originalmente recebida da Universidade de Nova Iorque (Nova Iorque, EUA), é mantida em camundongos albinos por passagens sanguíneas semanais de animal para animal. A cepa foi mantida também congelada em nitrogênio líquido (-196 °C), usando-se 50% de *glyceroligth* como crioprotetor.

Para preparação do inóculo foram preparados esfregaços sanguíneos de camundongos infectados com formas eritrocíticas do *P. berghei*, posteriormente corados pelo Panótico® e examinados em microscópio ótico (100×) para avaliação da percentagem de parasitemia. Após a seleção do animal ideal para o teste (10-20% de parasitemia) foi realizada a contagem de hemácias diluídas em PBS citratado com o auxílio da câmara de Neubauer. A partir da percentagem de parasitemia e do número total de hemácias foi preparado um inóculo padronizado de modo que cada animal do teste recebeu 200µL de PBS com  $10^5$  hemácias parasitadas, via intraperitoneal.

A avaliação da atividade antimalárica *in vivo* foi realizada utilizando o protocolo do teste supressivo de 4 dias descrito por Peters (1965) com modificações descritas em Rocha-e-Silva et al (2011). Após a infecção os camundongos foram divididos randomicamente em grupos de 5 animais por gaiola. Um grupo controle negativo tratado com o veículo e um grupo controle positivo tratado com dose curativa de 10 mg/kg/dia de cloroquina estavam presentes em todos os experimentos.

As substâncias teste foram administradas via oral e subcutânea por 4 dias consecutivos iniciados 24 h após inoculação dos animais com doses variando de 600 a 10 mg/kg/dia. Foram confeccionados esfregaços sanguíneos de cada animal no 5° e 7° dia de teste, sendo estes corados pelo Panótico® e os níveis de parasitemia determinados por contagem microscópica. A diferença entre a média da parasitemia do grupo controle negativo (100%) e o grupo teste foi calculada como porcentagem de supressão do crescimento do parasito (SCP) de acordo com a equação:

$$\text{Supressão da Parasitemia} = 100 \times (A - B)/A$$

A= Média da parasitemia do controle negativo

B = Média da parasitemia do grupo teste

A sobrevivência dos animais foi acompanhada por um período de 4 semanas. Cada amostra foi testada em dois ou três experimentos independentes. Para comparação das médias de parasitemia as análises de variância foram realizadas com *post hoc* Mann-Whitney teste (Origin 8.1 software; OriginLab).

#### **2.2.4 Atividade *in vitro* frente o *Plasmodium falciparum* do plasma inativado de camundongos que receberam 4-nerolidilcatecol via oral.**

Três grupos de cinco camundongos Webster suíços saudáveis foram tratados oralmente com 200 mg/kg de 4-nerolidilcatecol, 5mg/kg de cloroquina e 0,2 mL do veículo (2% Tween-20) respectivamente. 60 min após a administração das drogas os animais foram anestesiados e 100 µL de sangue foi retirado pelo plexo orbital com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*. Passados mais 60 min foi retirada uma nova amostra de sangue de cada animal. O sangue foi centrifugado e o plasma foi removido e inativado à 56°C por 30 min. O plasma inativado foi testado *in vitro* em culturas de *P. falciparum* conforme

descrito no item 1.2.3.1 da metodologia do capítulo 1, nas diluições de 1:10, 1:20 e 1:40. Foram utilizadas as cepas K1 e 3D7, e dois isolados de campo da região amazônica previamente estabilizados pelo nosso grupo de pesquisa (ROCHA-E-SILVA et al. 2012). O plasma dos animais que receberam cloroquina e veículo (controle positivo e negativo respectivamente) também foram testados nas mesmas condições. O potencial inibitório do plasma dos animais que receberam 4-nerolidilcatecol foi calculado pela comparação das parasitemias dos poços que receberam este plasma com as parasitemias dos poços que receberam o plasma do animal tratado somente com o veículo. As médias das parasitemias foram comparadas usando ANOVA e *test-t Student*. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativo.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários compostos nos últimos anos têm sido isolados de espécies nativas da Amazônia, alguns dos quais tem sido testados quanto a atividade antimalárica *in vitro* frente a cepas de *P. falciparum*, entretanto um número muito reduzido tem avançado para estudos mais complexos no modelo murino ou ao nível do mecanismo de ação (CRUZ et al. 2013; SILVA et al. 2011; WRIGHT 2005). Uma das razões para isto é que estes princípios ativos na maioria das vezes existem em quantidades ínfimas nos seus extratos de origem tornando-se quase impossível produzi-los em quantidades suficientes para testes farmacológicos no modelo animal (JIMENEZ-DIAZ et al. 2013).

Outra questão é o fato de que embora a Amazônia seja um dos maiores biomas do planeta e ocupe cerca de 49,3 % do território brasileiro, existem poucos centros de pesquisas instalados na região, o que dificulta a pesquisa em algumas áreas, sobretudo a de desenvolvimento de novos fármacos que requerem grandes investimentos em recursos humanos e infra-estrutura (CALDERON et al. 2009). A Fundação de Medicina Tropical – Heitor Veira Dourado (FMT-HVD) e o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) são instituições de pesquisa localizadas no Estado do Amazonas (centro da Amazonia Legal), onde grande parte do presente estudo foi realizado. Estas são exemplos de instituições que nos últimos anos tem se preparado para estudos pré-clínicos e clínicos de novos fármacos para doenças negligenciadas (POHLIT et al. 2013). A realização deste estudo foi favorecida pela colaboração com instituições de renome em pesquisas localizadas fora da região amazônica conforme descrito nos materiais e métodos.

Para o estudo de atividade antimalárica *in vivo* foi utilizado um pequeno grupo de substâncias selecionadas a partir das amostras testadas *in vitro* frente o *P. falciparum*. As substâncias puras com boa atividade e disponíveis em escala de grama foram priorizadas para os testes *in vivo*. O modelo experimental adotado aqui tem sido amplamente utilizado por vários grupos de pesquisa nas últimas cinco décadas desde a descrição do método (ANDRADE-NETO et al. 2004; BRANDAO et al. 1997; CARVALHO et al. 1991; CIMANGA et al. 1997; JIMENEZ-DIAZ et al. 2013; PETERS 1965).

Os critérios de atividade adotados foram adaptados dos convencionados na literatura que assumem uma atividade moderada para compostos que inibem de 30-50% do crescimento do *P. berghei in vivo*, sendo que a inibição abaixo deste nível classifica o composto como inativo, e acima de 50% o composto pode ser considerado ativo, testados em doses que variam entre 50-100 mg/kg/dia (COUTINHO et al. 2013; KRETTLI et al. 2009; REZENDE et al. 2013).

### 2.3.1 Atividade antimalárica *in vivo* de alcalóides indólicos

Os alcaloides indólicos **9-11b** (Figura 5) tiveram sua atividade antimalárica *in vivo* avaliada frente à cepa NK65 de *P. berghei* por via oral e subcutânea em camundongos Webster suíços. As doses testadas e as porcentagens de inibição estão demonstradas na tabela 10.

A elipticina (**9**) foi altamente ativa na dose oral de 50 mg/kg/dia (100% de inibição *versus* o controle no dia 5 e 7). A média de sobrevivência do grupo de camundongos tratados com esta dose foi maior que 40 dias, semelhante aos resultados obtidos para cloroquina. Elipticina também promoveu alta supressão dos parasitos (70%) pela via subcutânea no dia 7 na dose de 10 mg/kg/dia. Dos quatro alcalóides testados *in vivo* a elipticina foi considerada a mais ativa. Na dose mais alta administrada não houve mortalidade dos animais e nem foram observados efeitos tóxicos, em acordo com a baixa citotoxicidade da elipticina em células normais (ROCHA-E-SILVA et al. 2012).

A olivacina (**10**) exibiu uma alta atividade antimalárica *in vivo* (97% e 90% nos dias 5 e 7) na dose de 100 mg/kg/dia sem efeitos tóxicos observados nos camundongos. A atividade permaneceu alta na dose de 50 mg/kg/dia. Embora tenha apresentado boa inibição nas doses menores, sua atividade foi considerada mais baixa que o seu isômero estrutural elipticina (ROCHA-E-SILVA et al. 2012).

**Tabela 10: Supressão *in vivo* do *Plasmodium berghei* em camundongos infectados e sobrevida após tratamento oral e subcutâneo com alcaloides indólicos<sup>a</sup>**

Dose (mg/kg/dia)	Inibição da parasitemia (%)				Média da sobrevida ± DP (dias) <sup>b</sup>	
	Oral		Subcutânea		Oral	Subcutânea
	Dia 5	Dia 7	Dia 5	Dia 7		
<b>Ellipticina (9)</b>						
50	100	100	NT	NT	> 40	NT
10	77	42	33	70	27 ± 2	29 ± 3
1	67	61	0	44	22 ± 4	23 ± 5
<b>Olivacina (10)</b>						
100	97	90	14	55	26 ± 6	27 ± 2
50	91	90	NT	NT	23 ± 2	NT
10	48	64	40	44	27 ± 2	26 ± 2
1	25	42	7	45	24 ± 3	25 ± 1
<b>Criptolepina (11a)</b>						
50	43	50	63	61	24 ± 5	25 ± 4
10	38	28	21	46	18 ± 3	21 ± 3
1	3	5	16	31	17 ± 3	22 ± 2
<b>Derivado de Criptolepina (11b)</b>						
50	55	44	D	D	25 ± 4	3 ± 1
10	47	25	60	30	24 ± 4	24 ± 4
<b>Cloroquina</b>						
10	99	98	99	98	> 40	>40
Controle	-	-	-	-	20 ± 5	22 ± 3

<sup>a</sup> Compostos foram testados no modelo da malária de roedor com *P. berghei* NK65. Foram administrados pela via oral e subcutânea em diferentes doses por 4 dias e a parasitemia foi monitorada no 5° e 7° dia de acordo com o protocolo estabelecido por Peters, (1965).

<sup>b</sup> Média ± desvio padrão (dois experimentos independentes). NT=Não testado (ROCHA-SILVA et al. 2012).

A alta atividade *in vitro* frente ao *P. falciparum* e a baixa atividade *in vivo* frente ao *P. berghei* foram confirmadas para **11a**. Na dose mais alta testada de 50 mg/kg/dia pela via subcutânea, o composto apresentou inibição máxima de 63% no dia 5. Estudos anteriores reportam a atividade antimalárica *in vivo* de criptolepina em diferentes doses e vias de administração. Na dose de 50 mg/kg/dia subcutânea o derivado de criptolepina **11b** foi letal para os camundongos infectados. Pelo tratamento via oral houve uma atividade moderada (45-55% de inibição). Estudos anteriores mostram que criptolepina administrada subcutaneamente na dose de 113 mg/kg/dia não apresentou significativa redução de parasitemia em camundongos infectados por *P. berghei*, e foi tóxica pela via intraperitoneal na dose de 12,5 mg/kg/dia (KIRBY et al. 1995).

A toxicidade de **11a** aparentemente está relacionada à via intraperitoneal, uma vez que não foram observadas morte em camundongos tratados pela via subcutânea (113 mg/kg/dia) ou oral (50 mg/kg/dia) (WRIGHT et al. 2001). Nos estudos de Cimanga et al. (1997), criptolepina na dose de 50 mg/kg/dia pela via oral provocou aumento da parasitemia em camundongos infectados com *P. berghei* e significativo efeito quimiossupressivo em camundongos infectados com *P. yoelli*. Nos testes realizados neste trabalho não foram observados efeitos tóxicos para criptolepina mesmo na dose mais alta de 50 mg/kg/dia nas duas vias de administração.

O derivado de criptolepina hidrodicloridrato de 11-(4-piperidinamino) criptolepina (**11b**) obtido por *design* racional, foi considerado altamente seletivo em testes *in vitro* de atividade antiplasmódica e citotóxica realizados anteriormente (LAVRADO et al. 2011; LAVRADO et al. 2008). Apesar de suas propriedades *in vitro*, o derivado de criptolepina exerceu atividade moderada *in vivo* (60% de inibição máxima alcançada) com efeito tóxico agudo dependendo da via de administração utilizada. Na dose de 50 mg/kg/dia pela via subcutânea, os animais morreram no segundo dia de tratamento, e úlceras foram formadas no local da administração subcutânea na dose de 10 mg/kg/dia.

O presente estudo tem contribuído para comprovação de que o sistema heterocíclico com núcleo indólico possui importante atividade antimalárica *in vitro*. Também a alta atividade antimalárica *in vivo* de elipticina e olivacina comparada à criptolepina e seu derivado foi uma revelação importante.

### 2.3.2 Atividade antimalárica *in vivo* de limonóides

Os limonóides 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (**23**) e 7-deacetil-7-oxogedunina (**24**) foram isolados em escala de centenas de miligramas do resíduo da semente de *C. guanenses* (PEREIRA, 2013), o que permitiu sua avaliação no modelo de roedor. As substâncias foram testadas nas doses de 100 e 50 mg/kg/dia pela via oral e subcutânea. Os resultados do teste supressivo em camundongos infectados com *P. berghei* NK65 está apresentado na tabela 11.

**Tabela 11: Supressão *in vivo* do *Plasmodium berghei* em camundongos infectados e sobrevida após tratamento oral e subcutâneo com limonóides<sup>a</sup>**

Dose (mg/kg/dia)	Inibição da parasitemia (%)				Média da sobrevida $\pm$ DP (dias) <sup>b</sup>	
	Oral		Subcutânea		Oral	Subcutânea
	Dia 5	Dia 7	Dia 5	Dia 7		
6 $\alpha$ -acetoxigedunina (23)						
100	65.7	46.3	44.2	30.4	24 $\pm$ 3	22 $\pm$ 4
50	40.2	34.7	34.4	16.8	20 $\pm$ 3	21 $\pm$ 2
7-deacetil-7-oxogedunina (24)						
100	40.3	28.9	38.6	21.7	21 $\pm$ 3	22 $\pm$ 2
50	19.3	0	29.2	0	20 $\pm$ 2	21 $\pm$ 4
Cloroquina						
10	100	98	99	98	> 40	>40
Controle	-	-	-	-	21 $\pm$ 2	21 $\pm$ 3

<sup>a</sup> Compostos foram testados no modelo da malária de roedor com *P. berghei* NK65. Foram administrados pela via oral e subcutânea em diferentes doses por 4 dias e a parasitemia foi monitorada no 5° e 7° dia de acordo com o protocolo estabelecido por Peters, (1965).

<sup>b</sup>Média  $\pm$  desvio padrão (dois experimentos independentes). NT=Não testado (ROCHA-E-SILVA et al. 2012).

O limonóide **23** demonstrou maior atividade antimalárica *in vivo* que o limonóide **24**. A maior taxa de supressão *in vivo* observada para **23** foi na dose oral de 100 mg/kg/dia (65.7% de inibição comparado com o controle não tratado). O grupo de animais tratados com esta dose apresentou o maior tempo de sobrevivência do experimento ( $24 \pm 3$  dias), porém sem diferenças significativas em relação ao controle não tratado ( $p > 0,05$ ). Nas doses testadas, **23** administrado pela via subcutânea apresentou menor supressão de parasitemia que quando administrado pela via oral, sugerindo que fatores relacionados a esta via de administração como velocidade e absorção e metabolização hepática são importantes para atividade. A inibição máxima produzida por **24** foi observada no dia 5 na dose de 100 mg/kg/dia via oral (40,3%).

Os limonóides **23** e **24** administrado na dose oral de 50 e 100 mg/kg/dia, respectivamente, exibiram atividade antimalárica *in vivo* (40% de supressão de parasitemia) comparável à substância natural gedunina (**26**) em estudos anteriores quando foi administrada na dose de 50 mg/kg/dia à camundongos infectados com *P. berghei* ANKA. Também foi relatado que **26** não inibiu a parasitemia nas doses de 100 e 25 mg/kg/dia e desta forma não exibiu resposta dose-dependente (SILVA e NUNOMURA 2012). Supressão do *P. berghei in vivo* comparável a gedunina e uma clara resposta dose-dependente demonstra o potencial do derivado **23** de gedunina. Na identificação de novas substâncias com atividade antimaláricas *in vivo*, diversos autores consideram moderadamente ativa uma substância que inibe 30-50% da parasitemia e as substâncias inibem a parasitemia em 50 % ou mais nas mesmas doses testadas aqui são consideradas ativas (ANDRADE et al. 2007; COUTINHO et al. 2013; KRETTLI et al. 2009).

### 2.3.3 Atividade antimalárica *in vivo* de 4-nerolidilcatecol e derivados

O 4-nerolidilcatecol (**1**) foi testado para atividade antimalárica *in vivo* utilizando o teste de supressão de 4 dias de Peters (1965), em camundongos Webster suíços infectados com *P. berghei* NK65 tratados via oral e subcutânea

nas dose 600, 400 e 200 mg/kg/dia. Os resultados estão apresentados na tabela 12.

**Tabela 12: Supressão *in vivo* do crescimento de *Plasmodium berghei* em camundongos após tratamento oral e subcutâneo com 4-nerolidilcatecol (1).<sup>a</sup>**

Dose (mg/kg/dia)	Inibição da parasitemia (%)				Média da sobrevida ± DP (dias) <sup>b</sup>	
	Oral		Subcutânea		Oral	Subcutânea
	Dia 5	Dia 7	Dia 5	Dia 7		
0					21 ± 0	17 ± 3
200	14,5	54	0	41,0	22 ± 1	21 ± 0
400	34,4	48,8	0	40,6	24 ± 1	22 ± 3
600	63,1	59,7	0	61,5	26 ± 1	23 ± 4
Cloroquina						
5	97	93	95	91	32 ± 3	33 ± 3

<sup>a</sup> Compostos foram testados no modelo da malária de roedor com *P. berghei* NK65. Foram administrados pela via oral e subcutânea em diferentes doses por 4 dias e a parasitemia foi monitorada no 5° e 7° dia de acordo com o protocolo estabelecido por Peters (1965).

<sup>b</sup> Média ± desvio padrão (dois experimentos independentes) (ROCHA-E-SILVA et al. 2011)

Pela via oral, **1** na dose de 200 mg/kg/dia apresentou baixa supressão no dia 5 (14,5%) e uma supressão mais expressiva no dia 7 (54%). Um significativo efeito quimiossupressivo foi observado nos dias 5 e 7 (63,1% e 59,7%) com a dose oral de 600 mg/kg/dia. Em todas as doses administradas houve um aumento da sobrevida dos camundongos tratados em relação ao grupo controle. Pela via subcutânea **1** apresentou efeito quimiossupressivo significativo somente no dia 7 (40,6% a 61,3%). A mortalidade dos camundongos infectados não foi significativamente reduzida pelo tratamento com **1** nas doses de 400 e 200 mg/kg/dia. Um aumento significativo na sobrevida dos camundongos em relação ao controle não tratado, foi observado

somente nos grupo tratados com 600 mg/kg/dia pela via oral e subcutânea ( $p \leq 0,05$ ). Estes resultados foram publicados em Rocha-e-Silva et al. (2011).

Amorim et al. (1988; AMORIM et al. 1986) demonstraram que extratos etanólicos de *P. peltatum* e *P. umbellatum* produziram leve atividade supressiva *in vivo* sobre as formas sanguíneas de *P. berghei* (redução de parasitemia de 66% em concentrações relativamente altas). Outros estudos como o de Adami (1995) e Ferreira-da-Cruz et al. (2000), relataram inatividade para extratos etanólicos e hexânicos destas plantas. Todos estes estudos concordaram com a noção que estes extratos apresentam pouca ou insignificante atividade antimalárica *in vivo* com *P. berghei* e que diferenças nos resultados obtidos podiam ser explicadas pela variação na composição destes extratos como sugerido por Ferreira-da-Cruz et al. (2000) ou talvez por fatores farmacocinéticos descritos por Sala-Neto et al. (1992).

A supressão do crescimento da parasitemia *in vivo* observada nos roedores que receberam **1** via oral foi semelhante ao relatado por estudos anteriores com extratos de *Piper peltatum* e *P. umbellatum* conforme discutido acima. A atividade antimalárica *in vivo* observada somente no sétimo dia no tratamento pela via subcutânea pode ser resultado de uma absorção lenta com concentração plasmática inadequada provocando um efeito tardio da substância. Existe também a hipótese de que o metabolismo de primeira passagem no fígado é importante para **1**, que quando administrado por via subcutânea não passa por este processo.

A avaliação *in vitro* da atividade antimalárica apresenta as vantagens de observar o efeito direto da droga sobre o parasita da malária humana (*P. falciparum*) sem interferência dos fatores imunológicos, contudo este método provê pouca informação sobre a farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) do composto. A ação de fatores farmacocinéticos e imunológicos pode ser observada nos testes antimaláricos *in vivo*, porém estes utilizam espécie de *Plasmodium* de roedor, cuja extrapolação da biologia para as espécies de *Plasmodium* que infectam humanos não pode ser aplicada em todos os casos. Consequentemente a concordância das atividade antimaláricas *in vitro* e *in vivo* nos modelos

experimentais nem sempre ocorrem (NOGUEIRA e ROSÁRIO 2010; PETERS 1965). Esse fato foi observado para **1** que apresentou ótima atividade *in vitro* frente o *P. falciparum* e baixa atividade *in vivo* frente o *P. berghei* (ROCHA-E-SILVA et al. 2012).

Juntamente com as abordagens padrão discutidas acima, foi utilizada uma nova abordagem com a combinação dos dois métodos que provê o resultado dos fatores farmacocinéticos sobre o parasita da malária humana *P. falciparum*. Este método foi primeiramente descrito por Sala-Neto (1992), que ao testar extratos de *Piper peltatum in vivo* em camundongos infectados *P. berghei* pelo método tradicional detectou inatividade do extrato. Então administrou o extrato a camundongos saudios, e retirando o plasma deles 30 min depois testou este plasma frente ao *P. falciparum in vitro*. Interessantemente o plasma dos animais saudáveis que ingeriram o extrato aquoso de *P. peltatum* inibiu o crescimento *in vitro* do *P. falciparum* em 49% comparados com o controle negativo. Semelhante abordagem foi utilizada aqui com **1** (ver método item 2.2.4).

O plasma de camundongos saudios que receberam 200 mg/kg via oral de **1** foi testado *in vitro* frente as cepas K1 e 3D7, e dois isolados de campo regionais de *P. falciparum*. Existem diferenças genéticas significativas entre cepas padrão em cultivo a mais de 20 anos e Isolados de campo recém-estabilizados, pois o parasita apresenta um importante polimorfismo gênico. Os isolados de campo refletem melhor a realidade dos parasitas atualmente circulantes em uma região, e são importante ferramentas para o estudo de drogas (ROCHA-E-SILVA et al. 2012). O plasma do sangue retirado 60 e 120 min após a administração de **1** foi inativado para desnaturaçã das imunoglobulinas. As culturas tratadas com o plasma dos animais que receberam o veículo foi considerada como 100% de crescimento. Os resultados estão apresentados na tabela 13.

**Tabela 13: Efeito do plasma diluído de camundongos que ingeriram 4-nerolidilcatecol sobre formas sanguíneas de *P. falciparum in vitro*.**

Diluição do plasma	% de Inibição do Plasma 60 min <sup>a</sup>				% de Inibição do Plasma 120 min			
	Cepa/Isolado de campo				Cepa/Isolado de campo			
	K1	3D7	M1	M2	K1	3D7	M1	M2
01:10	86,3	73,3	58,6	82,9	58,5	51,7	56,5	18,6
01:20	86,3	0	0	5,7	12,6	21,6	30,2	1,4
01:40	0	0	0	0	0	0	0	0

a: % de inibição calculada pela comparação da parasitemia dos poços teste (que receberam o plasma dos camundongos tratados com **1**) com a parasitemia dos poços que receberam o plasma dos camundongos tratados com o veículo). *P* valor  $\leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significante.

O plasma do sangue dos camundongos retirado após 60 min de ingestão de **1** inibiu 86,3-58,6% do crescimento do *P. falciparum in vitro* na diluição 1:10, tendo o efeito diminuídos nas diluições seguintes. A atividade do plasma retirado 120 min após a ingestão de **1** foi significativamente menor em relação ao anterior, sugerindo uma diminuição dos níveis plasmáticos dos metabólitos ativos. Rezende et al. (2004) demonstrou que **1** administrado via intravenosa apresentou larga distribuição e uma rápida eliminação, o que é esperado para drogas lipofílicas como **1**. Semelhantemente ao observado por Sala-Neto (1992) para os extratos de *P. peltatum*, nossos dados demonstram que a ingestão de **1** produz metabólitos que são pouco ativos frente o *P. berghei* mas inibem *P. falciparum in vitro*. O plasma dos animais que receberam cloroquina não apresentou atividade inibitória nas linhagens de *P. falciparum* testadas, o que está associado à sub-dose de cloroquina utilizada no ensaio uma única vez.

**1** é a substância majoritária no extrato etanólico da raiz de *P. peltatum* com rendimento > 5% (m/m) da raiz seca. Dado o interesse no grande espectro de atividades biológicas de **1**, foram realizados estudos de propagação de *P. peltatum* com o objetivo de obter **1** em grande escala para estudos

farmacológicos. Pinto et al., (2010) padronizaram ótimas condições para produção de **1** a partir do cultivo de *P. peltatum* com um rendimento de 27 kg da substância por hectare de planta cultivada. Os efeitos biológicos de **1** mencionados anteriormente e a possibilidade de produzir o composto em grande escala encorajam pesquisas para desenvolver esta substância como um possível medicamento da Amazônia, uma vez que o uso sustentável dos recursos naturais é uma das melhores formas de preservação (CALDERON et al. 2009). Por isso foram preparados derivados semi-sintéticos visando melhorar a estabilidade do composto e as propriedades farmacológicas (PINTO et al. 2009). A produção de derivados semi-sintéticos é uma importante etapa no desenvolvimento de novos fármacos.

Os derivados de **1**, 1,2-*O,O*-diacetil 4-nerolidilcatecol (**12**) (figura 6) e 1,2-*O,O*-dibenzoil 4-nerolidilcatecol (**5**) (figura 4) foram testados para atividade antimalárica *in vivo* em camundongos BALB/c infectados com *P. berghei* em três experimentos independentes. Os resultados da inibição do crescimento do *P. berghei* pelas substâncias e a média de sobrevivência de cada grupo testado está apresentado na tabela 14.

O derivado **12** apresentou uma importante atividade inibitória *in vivo* frente a *P. berghei*. Na dose mais alta de 600 mg/kg/dia, houve uma supressão da parasitemia no quinto dia após início do tratamento de 72% quando foi administrado pela via subcutânea, e de 64% quando administrado pela via oral. Na dose de 50 mg/kg/dia, uma dose bastante utilizada na identificação de novas drogas na malária murina, a atividade inibitória permaneceu acima de 30% no 5° e 7° dia de observação em ambas as vias de administração.

Os dados demonstram uma atividade dose-dependente uma vez que na dose de 10 mg/kg/dia a atividade decai para o nível zero na via subcutânea e se apresenta muito baixa na via oral. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de inibição dos animais tratados pela via oral e subcutânea com **12**, sugerindo que introdução de dois grupos acetil nas hidroxilas fenólicas mantém a substância ativa e estável nas duas vias de administração.

**Tabela 14. Supressão *in vivo* do crescimento de *Plasmodium berghei* em camundongos após tratamento oral e subcutâneo com *O,O*-diacetil 4-nerolidlcatecol (**12**) e 1,2-*O,O*-dibenzoil 4-nerolidlcatecol (**5**).<sup>a</sup>**

Dose (mg/kg)	Inibição da parasitemia (%)				Média da sobrevivência ± DP (dias) <sup>b</sup>	
	Oral		Subcutânea		Oral	Subcutânea
	Dia 5	Dia 7	Dia 5	Dia 7		
<b>1,2-<i>O,O</i>-diacetil 4-nerolidlcatecol (<b>12</b>)</b>						
600	64	56	72	70	22±2	22±3
200	62	48	60	66	21±3	19±3
50	44	32	33	37	18±4	19±4
10	23	12	0	0	20±3	17±2
<b>1,2-<i>O,O</i>-dibenzoil 4-nerolidlcatecol (<b>5</b>)</b>						
200	46	28	48	17	21±3	20±2
50	27	23	32	0	20±2	19±4
10	0	0	0	0	19±1	17±4
<b>Chloroquine</b>						
10	100	99	99	99	> 40	>40
<b>Controle</b>					19± 4	21± 3

<sup>a</sup> Compostos foram testados no modelo da malária de roedor com *P. berghei* NK65. Foram administrados pela via oral e subcutânea em diferentes doses por 4 dias e a parasitemia foi monitorada no 5° e 7° dia de acordo com o protocolo estabelecido por Peters, 1965.

<sup>b</sup> Média ± desvio padrão (dois experimentos independentes).

O derivado **5** apresentou níveis de redução de parasitemia mais baixo em relação ao derivado **12**, com a inibição máxima obtida de 48% no 5° dia de observação quando administrado pela via subcutânea, mas ainda é considerado ativo. No 7° de observação observou-se uma diminuição da atividade em relação ao 5° em todas as doses das duas vias de administração.

É importante notar que estudos antimaláricos *in vivo* em roedores publicados recentemente tem considerado amostras que causam supressão de parasitemia  $\geq 30\%$  em doses de 50-100 mg/kg/dia como parcialmente ativa e indicadas para continuidade de estudos farmacológicos (ANDRADE et al. 2007; KRETTLI et al. 2009). Coutinho et al. (2013) coconsiderou ativo os compostos que inibiram mais que 40% a parasitemia em doses entre 100-50 mg/kg/dia. Naftoquinonas administradas na dose de 100 mg/kg/dia foram consideradas ativas ao inibir a parasitemia em 53% (REZENDE et al. 2013). Ademais, drogas clinicamente utilizadas tais como a quinine ( $DE_{50}=34$  mg/kg/dia frente ao *P. berghei* ANKA) (GARAVITO et al. 2012) e derivados de artemisinina como artesunato de sódio (recrudescer na dose de 80 mg/kg/dia) (LOMBARD et al. 2013), podem não ter atividade ótima no modelo murino, mas tem valor terapêutico inquestionável. Desta forma, a produção e estudos *in vivo* em modelos de roedores de um número maior de derivados de **1** devem ser realizados para otimizar a estrutura do composto.

Não houve melhora significativa no tempo de sobrevivência dos animais em relação ao controle em nenhum dos grupos testados com os compostos **12** ou **5**, embora os animais tratados pela via oral com 600 mg/kg/dia de **12** tenham tido um tempo médio de sobrevivência de  $22 \pm 2$  dias. Nos grupos controle positivos tratados com cloroquina na dose de 10 mg/kg/dia foi observado uma inibição entre 99-100% em todos os dias de observação com uma sobrevivência média superior a 40 dias.

As modificações moleculares de mono-O ou di-O, O grupos substituintes em **1**, não aumentaram significativamente a atividade antimalárica *in vitro* frente o *P. falciparum*, porém conferiram grande estabilidade relativa para **1** (PINTO et al. 2009; LIMA et al. 2013). Os dois derivados aqui testados apresentaram efeito antimalárico *in vivo* superior ao anteriormente relatado

para **1**. O derivado **5** apresentou atividade *boderline* na dose de 200 mg/kg/dia com 48% de inibição, considerada mediana dada a alta dose.

Ao contrário do que foi observado com **1** e **5**, a adição do grupo acetil nas duas hidroxilas fenólicas que produziu **12** conferiu um aumento significativo da atividade *in vivo* deste derivado em relação ao produto original. Na dose de 200 mg/kg/dia é possível notar uma inibição da parasitemia de 66% no dia 7, ainda permanecendo ativo até a dose de 50 mg/kg/dia. É interessante ressaltar que não houve morte nem sinais de intoxicação em nenhum animal tratados com 2000 mg/kg de **12** no teste de toxicidade aguda, que é uma dose extremamente alta (dados não mostrados).

Acredita-se que o aumento da atividade antimalárica *in vivo* do derivado **12** em relação à **1** deve-se à estabilização que o grupo acetil-éster confere à molécula pelo seu efeito retirador de elétrons, o que diminui a susceptibilidade de **12** à oxidação e outras reações. É razoável assumir que alguns grupos substituintes tais como grupo acetil, sofrem rápida hidrólise em condições fisiológicas pela ação de enzimas específicas e não-específicas nos tecidos (LIMA et al. 2013), porém estas suposições precisam ser confirmadas com estudos futuros de absorção, distribuição metabolismo e excreção (ADME).

## 2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS DO CAPÍTULO

Testes de atividade antimalárica *in vivo* em roedores constituem uma atividade de pesquisa importante para a descoberta e desenvolvimento de novos antimaláricos. A implementação pioneira destas metodologias no Estado do Amazonas durante o desenvolvimento da tese através da estruturação de espaços físicos adequados e formação de recursos humanos representa um grande avanço para a pesquisa da malária na região. Os compostos aqui testados, oriundos de plantas amazônicas, demonstraram importante poder inibitório sobre as formas sanguíneas de *P. berghei in vivo*.

O limonóide **23** isolado do resíduo da semente de *C. guianense* exibiu significativa atividade antimalárica *in vivo*. Futuros derivados desta substância devem ser preparados para melhorar sua atividade antimalárica.

4-Nerolidilcatecol (**1**) foi pouco ativo, mas as modificações moleculares que produziram os derivados **5** e **12** demonstraram-se eficientes ao aumentar a atividade *in vivo* dos compostos, sendo o derivado **12** o que se mostrou mais ativo *in vivo*. Este estudo ressalta a importância de se continuar investindo na produção de novos derivados de **1** para otimização da atividade, e reafirma a prova de conceito de que derivados de produtos naturais podem apresentar propriedades farmacológicas melhores que seus produtos naturais originais.

Dentre todas as substâncias estudadas neste capítulo a elipticina (**9**) e olivacina (**10**) se mostraram as mais ativas no modelo experimental da malária *in vivo*. O estudo comparativo com os demais alcalóides análogos destaca a estrutura da elipticina e olivacina como um importante protótipo para o desenvolvimento de drogas. Futuros estudos farmacológicos, toxicológicos e químicos relacionados à otimização da estrutura devem ser realizados.

Os principais compostos testados *in vivo* neste capítulo foram conduzidos para estudos de mecanismo de ação descritos no capítulo a seguir.

## Capítulo 3

---

**ESTUDOS SOBRE OS MECANISMOS DE AÇÃO  
ANTIMALÁRICO DE ALCALÓIDES INDÓLICOS E  
DERIVADOS DE 4-NEROLIDILCATECOL.**

### 3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1.1 Alvos terapêuticos e estudo do mecanismo de ação de drogas antimaláricas.

Os avanços recentes no conhecimento da biologia do *Plasmodium*, assim como a disponibilidade da sequência do genoma, forneceram uma gama de alvos farmacológicos para o desenvolvimento de novas drogas (MILLER et al. 2013). Os parasitos da malária possuem diversos sistemas metabólicos muito diferentes dos sistemas do hospedeiro, através dos quais eles se adaptam ao ambiente específico do hospedeiro. Enzimas ou vias metabólicas essenciais a sobrevivência do parasito que são ausentes em mamíferos, sobretudo em humanos, são importantes alvos validados para o desenvolvimento de novas drogas (JANA e PALIWAL 2007).

Nos últimos anos esforços científicos tem sido realizados para prover ferramentas químicas e bioquímicas que permitam explorar a biologia de alvos prioritários do *Plasmodium*, e provê um ponto de partida para validação destes alvos. Um grande número de alvos moleculares pode ser relacionado à funções de estruturas distintas de organelas da fase sanguínea assexuada do *Plasmodium* spp (CROWTHER et al. 2011).

Entre os processos celulares do parasito que tem sido estudados como alvos de drogas estão (FIDOCK et al. 2004):

- no citosol: glicólise, síntese de proteínas, transdução de sinais e metabolismo de folatos (onde agem a pirimetamina, proguanil e sulfadoxina);
- nas membranas celulares: síntese de fosfolípidos e transportadores de membrana (onde agem alguns quinolínicos e artemisinínicos);
- no vacúolo digestivo: hidrólise de hemoglobina, polimerização do heme (onde age a cloroquina) e produção de radicais livres (onde age a artemisinina);
- na mitocôndria: transporte de elétrons (onde age a atovaquona);
- no apicoplasto: síntese de proteínas, síntese e transcrição de ácidos nucleicos, biossíntese tipo II de ácidos graxos, biossíntese de isoprenóides e prenilação de proteínas (sem drogas disponíveis).

Alguns destes processos, embora tenham alvos moleculares bem definidos disponíveis para ensaios de *high throughput*, até o momento nenhuma droga do esquema terapêutico atual da malária ou que esteja em fase clínica de desenvolvimento foi descoberta a partir desta abordagem. Porém *screening* de grandes bibliotecas de compostos em alvos moleculares específicos tem revelado algumas substâncias que apresentam boa atividade *in vitro* (CROWTHER et al. 2011; GAMO et al. 2010; MILLER et al. 2013).

A maioria das drogas que ora são utilizadas para tratar malária não foram desenvolvidas com base na identificação racional em alvos moleculares específicos, mas foram descobertas a partir de plantas popularmente utilizadas para tratar malária. A quinina foi isolada de *Chinchona* sp. e artemisinina isolada de *A. annua*. Cloroquina, mefloquina e primaquina são análogos de quinina. Artesunato e artemeter são derivados diretos do produto natural artemisinina. As demais drogas já eram ativas contra outros patógenos (ex. antifolatos e tetraciclina). (FIDOCK et al. 2004).

Durante muitos anos, pouco se sabia sobre o mecanismo de ação e resistência destas drogas, e isto não era percebido como um problema importante uma vez que as drogas se mostravam eficientes. Com o surgimento da resistência e a falta de controle da doença se tornou clara a necessidade do conhecimento dos possíveis pontos de vulnerabilidade do parasito e dos mecanismos básicos através dos quais as drogas agem, não só para gerar novos medicamentos com novos mecanismos de ação, mas também para melhor utilização dos medicamentos disponíveis (GAMO et al. 2010).

Desta forma, as drogas tradicionais tiveram seus mecanismos de ação estudados através de uma abordagem “reversa” onde procurou-se no parasito os sítios de interação molecular de drogas já clinicamente validadas. Os sistemas biológicos no parasito onde estas drogas agem são importantes alvos, para o estudo de outras substâncias potencialmente ativas. Um exemplo pertinente é a cloroquina que age no vacúolo digestivo inibindo a polimerização do heme, conforme será discutido posteriormente (THOME et al. 2013).

Com o objetivo de propor possíveis mecanismos de ação antimalárico para as substâncias ativas *in vitro* e *in vivo* estudadas pelo nosso grupo de

pesquisa, neste trabalho focalizamos a via de biossíntese de isoprenóides e o processo de polimerização do heme e formação de hemozoína, que são as vias que possivelmente se relacionam com os principais compostos aqui estudados.

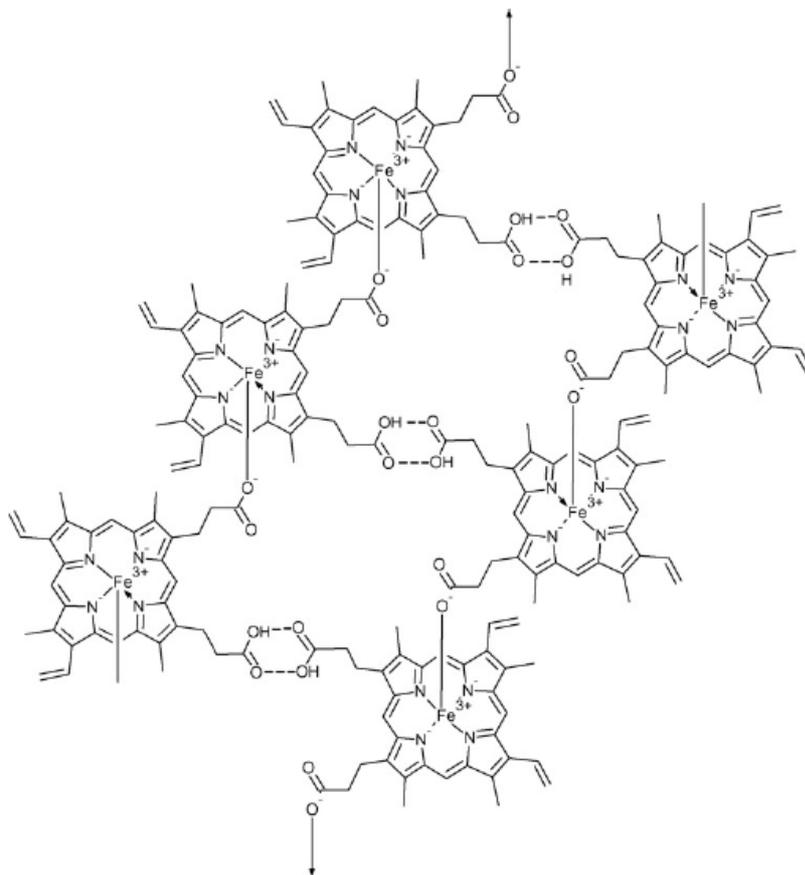
### 3.1.2 Polimerização do heme e formação de hemozoína

Durante seu estágio sanguíneo, é conhecido que o parasito da malária digere de 60% a 80% da hemoglobina presente nos eritrócitos. Este processo ocorre no vacúolo digestivo do parasito e é catalisado por enzimas proteolíticas. É amplamente aceito que os aminoácidos provenientes da degradação são fonte de alimento para o parasito, e recentes evidências confirmam que uma pequena fração destes aminoácidos é utilizada para a síntese de proteína. Durante o processo de degradação todo o heme presente na hemoglobina é liberado para o vacúolo digestivo. O ferro é oxidado de Fe(II) a Fe(III) por mecanismos não muito bem esclarecidos, embora presumase que o O<sub>2</sub> atue como oxidante (EGAN 2008).

O parasito converte o heme tóxico no composto hemozoína não-tóxico por um mecanismo conhecido como formação de hemozoína e este processo é considerado o mais importante mecanismo de detoxificação do heme em *Plasmodium sp.* O mecanismo de formação de hemozoína ainda não está bem esclarecido. Embora a formação de hemozoína seja geralmente aceita como um processo de biomineralização pelo qual o heme livre é rapidamente convertido no cristal de hemozoína, outras teorias tem sido propostas (KUMAR et al. 2007). Na Figura 11 temos representada uma das propostas para a estrutura química da hemozoína.

A formação de hemozoína é um alvo validado para a maioria das drogas antimaláricas já existentes e é considerada como um alvo adequado para o desenvolvimento de novos antimaláricos. A natureza química de novos compostos que mostram atividade antimalárica por meio da inibição da formação de hemozoína é interessante pois podem ajudar a conceber futuros

antimaláricos com potencial terapêutico contra cepas multi-resistentes de *Plasmodium sp* (CHONG e SULLIVAN 2003).



**Figura 11. Estrutura molecular da hemozoina proposta por Egan (2008).**

A cloroquina é o principal exemplo de droga antimalárica cujo mecanismo de ação está relacionado à inibição da formação de hemozoína. Embora o mecanismo de ação da cloroquina ainda não esteja completamente elucidado, acredita-se que a cloroquina acumula-se no interior do vacúolo digestivo e liga-se à hematina, um produto intermediário da formação de hemozoína. A hematina livre interfere no processo de detoxificação do heme o que conduz a danos na membrana por peroxidação lipídica (THOME et al. 2013).

### 3.1.3 Via de biossíntese de isoprenóides em *Plasmodium falciparum*

Através da análise de biologia celular e molecular foi percebida que a maioria dos membros do filo Apicomplexa abriga uma organela parecida com um plastídeo, chamada de apicoplasto, a qual provavelmente é derivada a partir do engolfamento de algas vermelhas em tempos remotos. Presume-se que no apicoplasto exista um número de vias metabólicas únicas não encontradas em hospedeiros vertebrados, tornando-o a fonte ideal para alvos de drogas, das quais a via de biossíntese de isoprenóides é uma das mais importantes (RALPH et al. 2004).

Os isoprenóides compreendem um vasto grupo de compostos, consistindo-se um dos maiores grupos de produtos naturais presentes em todos os organismos eucariontes e procariontes. Acredita-se que existam mais de 35.000 membros desta classe com estruturas e funções distintas. Todos estes compostos são sintetizados a partir de dois blocos estruturais com 5 carbonos: isopentenil-pirofosfato (IPP) e dimetil-alil-pirofosfato (DMPP), que após reações de condensação, ciclização e oxidação do esqueleto carbônico formam a variedade de compostos que conhecemos. Muitos tipos de isoprenóides (esteróides, colesterol, retinóides, ubiquinonas e grupos de proteínas preniladas) são essenciais ao funcionamento do maquinário celular (JORDAO et al. 2011).

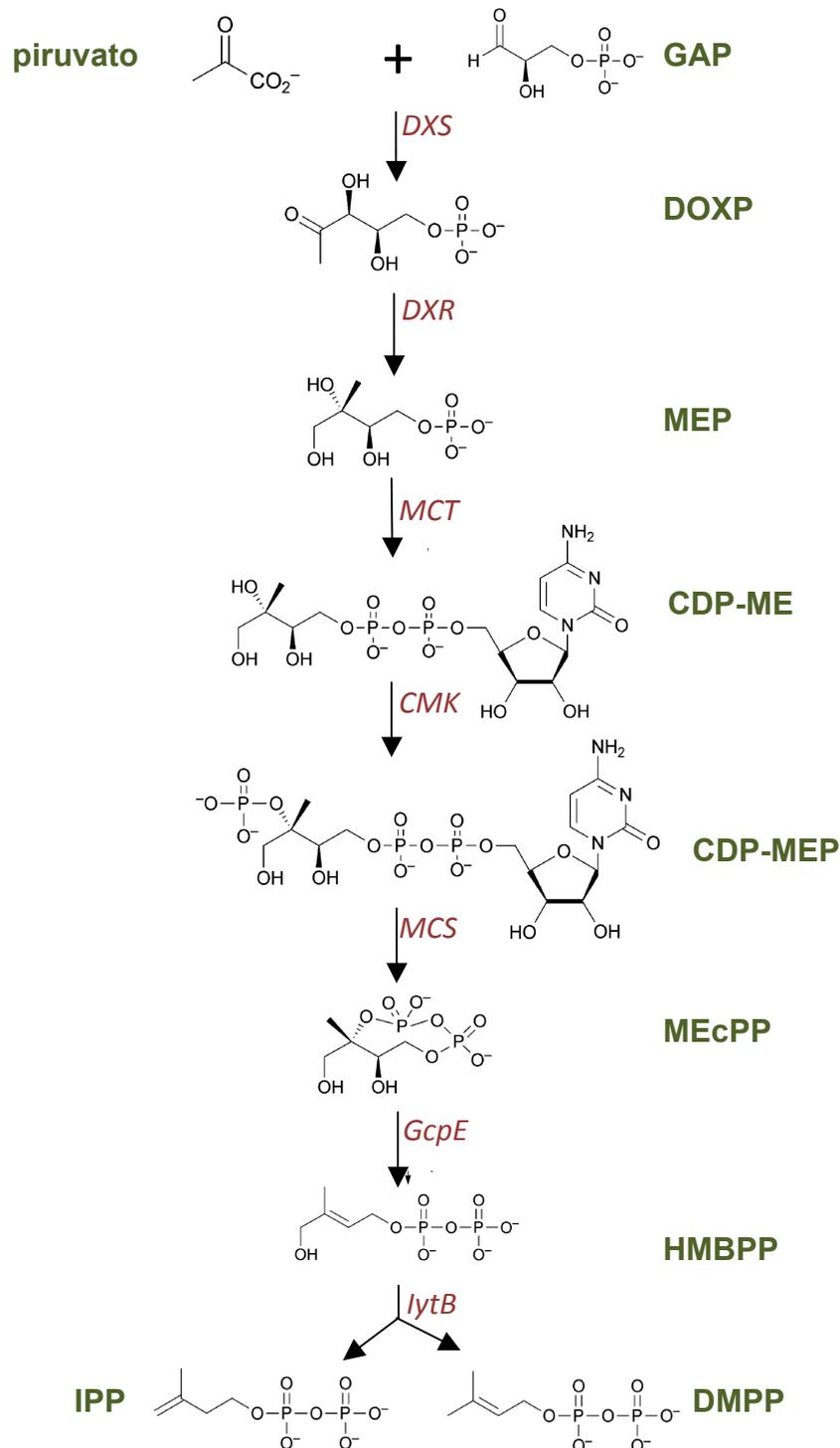
Durante décadas acreditou-se que em todos os organismos, os precursores IPP e DMPP eram sintetizados apenas pela via do mevalonato (MVA) descrita pela primeira vez na década de 1950 (LYNEN 1967). Todas as enzimas que atuam nas etapas de biossíntese da via MVA foram isoladas e estudadas em diferentes organismos, tanto animais como vegetais. Em seres humanos os isoprenóides são sintetizados exclusivamente por esta via (SPURGEON 1981).

No início dos anos 1990s aumentaram as evidências de uma via alternativa para síntese dos precursores isoprênicos. Rohmer e Arigoni realizaram um estudo sobre a biossíntese de hopanóides (esteróis triterpênicos pentacíclicos) usando [1-<sup>13</sup>C] acetato de sódio como precursor e comprovaram

a existência dessa via em bactérias, denominada de via independente do mevalonato (nMVA) ou via do 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) (figura 12), nome do primeiro precursor exclusivo da via (DISCH et al. 1998; ROHMER 1998; ROHMER 1999). Enquanto os mamíferos, algumas eubactérias e o citosol de plantas e fungos utilizam a via do mevalonato, a via do não-mevalonato é encontrada em algas, cianobactérias, nos cloroplastos de plantas, eubactérias e parasitos do filo Apicomplexa (incluindo *Plasmodium* spp.) (VAN DER MEER e HIRSCH 2012).

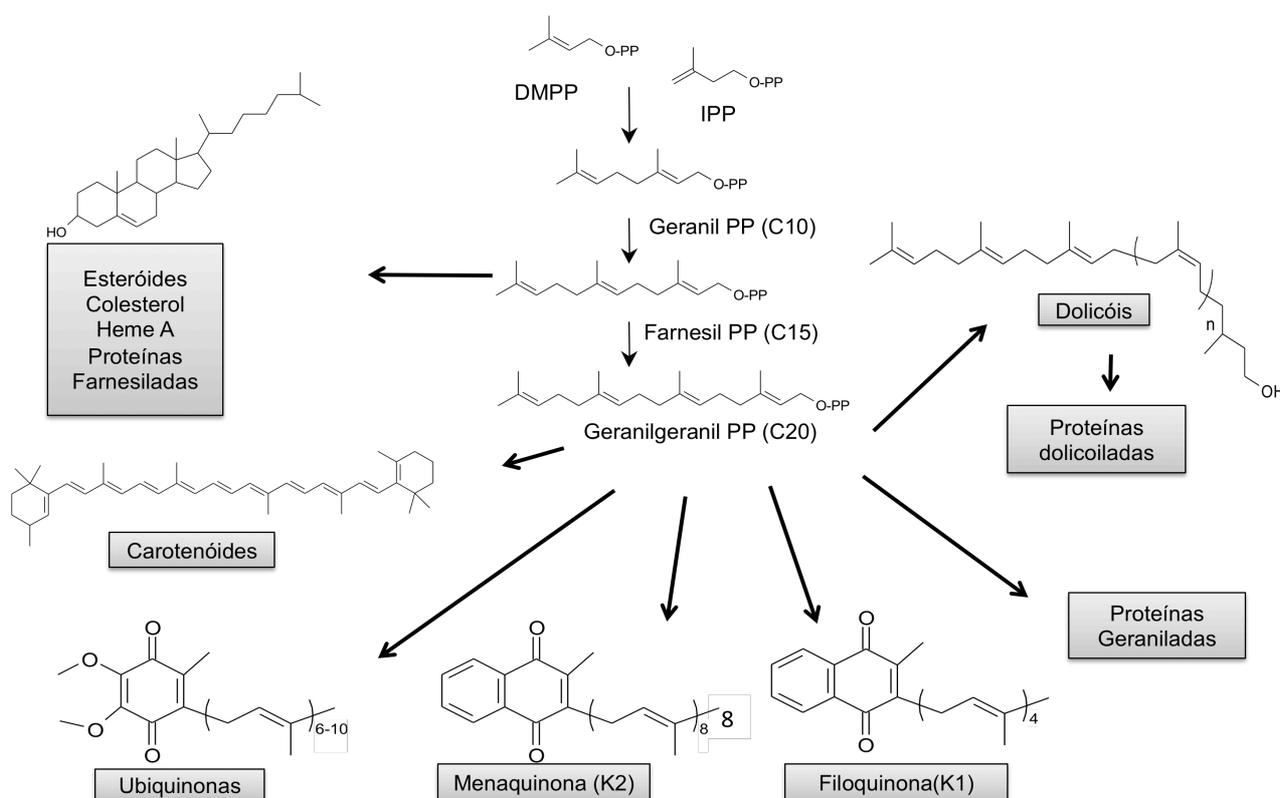
Várias tentativas de fornecer evidências da existência da via do mevalonato em *P. falciparum* levaram a resultados inconclusivos. Finalmente Jomaa et al. (1999), demonstraram a existência da via MEP nesse parasito através da inibição da via por fosmidomicina, e também encontrando os genes de duas enzimas da via, a DOXP sintase e DOXP redutoisomerase no *P. falciparum*. Cassera et al. (2004) caracterizou bioquimicamente todos os intermediários da via MEP em *P. falciparum*, com exceção do último intermediário, comprovando que essa via é funcional nesse parasito. Atualmente, essa via é considerada a única via de biossíntese de isoprenóides em *P. falciparum*. A biossíntese de quase todos os produtos finais da via dos isoprenóides já foi evidenciada no *P. falciparum*. Cada um dos compostos desempenha papéis cruciais para a fisiologia e conseqüentemente a sobrevivência do parasito (COUTO et al. 1999; D'ALEXANDRI et al. 2006; SUSSMANN et al. 2011; TONHOSOLO et al. 2009; TONHOSOLO et al. 2010).

Após a biossíntese das unidades de IPP e DMPP pela via MEP, estes dois metabólitos se ligam pela ação de enzimas chamadas preniltransferases, adando origem ao geranyl pirofosfato (GPP, 10 carbonos). O GPP é ligado a um IPP, originando o farnesil pirofosfato (FPP, 15 carbonos), que por vez é ligado a mais uma molécula de IPP, dando origem ao geranylgeranyl pirofosfato (GGPP, 20 carbonos) (figura 13). A partir desse ponto, a cadeia isoprênica pode continuar a ser aumentada pela adição de moléculas de IPP, formando ubiquinonas, dolicolis e vitaminas, ou duas moléculas de GGPP podem ser ligadas e dar origem ao fitoeno, molécula-base para a biossíntese de carotenóides (JORDAO et al. 2011; TONHOSOLO et al. 2009).



**Figura 12: Via MEP para biossíntese de isopentenil-pirofosfato (IPP) e dimetil-alil-pirofosfato (DMPP):** piruvato; **GAP**, gliceraldeído-3-fosfato; **DOXP**, 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato; **MEP**, 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato; **CDP-ME**, 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol; **CDP-MEP**, 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato; **MEcPP**, 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato; **HMBPP**, 1-hidroxi-2-metil-2-butenil 4-difosfato. Enzimas: **DXS**, 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato sintetase; **DXR**, 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase; **MCT**, 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato citidil-transferase; **CMK**, 4-(citidina-5'-difosfo)-2C-metil-eritritol quinase; **MCS**, 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintase; **GcpE**, hidroximetilbutenil difosfato sintase; **IytB**, hidroximetilbutenil difosfato redutase (VAN DER MEER e HIRSCH 2012).

Os produtos finais da via de biossíntese de isoprenóides sintetizados a partir de IPP e DMPP já caracterizados em *P. falciparum* estão representados na figura 13. A ubiquinona ou coenzima Q (figura 13) é um importante carreador de elétrons, e foi determinada a presença de duas ubiquinonas contendo 8 e 9 unidades isoprênicas ligadas ao núcleo 2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona em *P. falciparum*, as quais são sintetizadas na mitocôndria do parasito e é intensamente utilizada no metabolismo (JORDAO et al. 2011).



**Figura 13: Diagrama representando a biossíntese de produtos finais da via de isoprenóides em *P. falciparum* (JORDAO et al. 2011).**

Dolicois (Figura 13) são isoprenóides de longas cadeias com número variável de unidades isoprênicas. Estão diretamente relacionados a processos de glicosilação e ancoragem de proteínas. Pesquisas demonstraram a presença de dolicol de 55 e 60 carbonos no parasito evidenciando que as formas intra-eritrocitárias de *P. falciparum* sintetizam dolicois de 11 e 12 unidades isoprênicas nos três estágios parasitários, sendo mais evidente nos

esquizontes (COUTO et al. 1999; D'ALEXANDRI et al. 2006). Esta foi a primeira vez que tal estrutura foi descrita em representantes do *Phylum* Apicomplexa.

Estudos demonstraram que terpenos que apresentaram alta atividade antimalárica *in vitro* inibiram determinados pontos da biossíntese de isoprenóides em *P. falciparum* diminuindo drasticamente a produção de alguns metabólitos da via como dolicois e ubiquinonas (RODRIGUES GOULART et al. 2004). Todas estas evidências sinalizam que a via MEP de biossíntese de isoprenóides em *P. falciparum* é funcional e importante para a sobrevivência do parasito, e portanto um alvo interessante para novas drogas.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Substâncias químicas

Para os testes de mecanismo de ação foram selecionadas substâncias puras que apresentaram boa atividade antimalárica *in vitro* frente o *P. falciparum* (tabela 6, capítulo 1) e *in vivo* frente o *P. berghei* (tabelas 10 e 13 capítulo 2) obtidos conforme descrito no item 1.2.1 do primeiro capítulo:

- Alcalóides indólicos elipticina (**9**), olivacina (**10**) e triflato de criptolepina (**11a**);

- Dois derivados de 4-nerolidilcatecol (**1**): 1,2-O,O-diacetil 4-nerolidilcatecol (**12**) e 2-O-benzil 4-nerolidilcatecol (**4**).

Os testes de mecanismo de ação adotados foram escolhidos com base no entendimento da natureza química das substâncias estudadas. Alcalóides indólicos são sugestivos de inibir a formação de hemozoína (EGAN 2008) e a cadeia lateral de 4-nerolidilcatecol possui muita semelhança com alguns intermediários da via dos isoprenóides forme sera apresentado na discussão. Uma vez que **1** é instável, o estudo de mecanimso de ação foi conduzido com os seus derivados.

### 3.2.2 Teste de inibição de formação de hemozoína

O teste de inibição de formação de hemozoína foi realizado no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR-FIOCRUZ) em Belo Horizonte-MG, sob a orientação da Dra. Antoniana Krettli. Foram testadas neste ensaio as substâncias: elipticina (**9**), olivacina (**10**), criptolepina (**11a**), O,O-diacetil-4-nerolidilcatecol (**12**) e 2-O-benzil 4-nerolidilcatecol (**4**). Como controle positivo foi utilizado o sulfato de Cloroquina (Sigma-Aldrich).

O ensaio foi realizado conforme descrito em Ncokazi (2005) com modificações descritas em Aguiar (2012). A cloroquina foi dissolvida em água e

as demais substâncias em metanol nas concentrações testes que variaram de 40 a 0,156 mg/mL. As diluições de cada amostra foram testadas em triplicata. Em uma microplaca de 96 poços com fundo oval foram adicionados 20 µL de solução das substâncias nas concentrações teste, aos quais foram adicionados 101 µL de solução de hematina bovina (Sigma-Aldrich) à 1,68 mM diluído em NaOH 0,1M. A cada poço foi adicionado 58 µL de tampão acetato de sódio 12M sob agitação constante e temperatura de 60°C. A placa foi incubada em banho-maria à 60°C por 1 h, sendo posteriormente centrifugada a 500g por 8 min.

O sobrenadante foi descartado e os cristais de hemozoína presentes nos poços foram redissolvidas em 200 µL de NaOH 0,1 M e transferidos para outra microplaca de fundo chato. A placa foi lida por uma leitora de ELISA no comprimento de onda de 405 nm. O resultado foi expresso em porcentagem de inibição de produção de hemozoína onde os poços controle sem as substâncias teste representam 100% de formação de hemozoína. Foram realizados três experimentos independentes com cada substância. Na análise de correlação foram utilizados os testes de Pearson (dados paramétricos) e Spearman (dados não-paramétricos). Todos os testes foram considerados significativos quando apresentaram um valor de  $p \leq 0,05$ .

### **3.2.3 Avaliação do efeito de derivados de 4-nerolidilcatecol sobre a via de biossíntese de isoprenóides em *Plasmodium falciparum* in vitro**

O teste metabólico de inibição da via de biossíntese de isoprenóides em *P. falciparum* foi realizado no Laboratório de Malária do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), sob a orientação do Dr. Alejandro Katzin. Foram testadas neste ensaio as substâncias: O,O-diacetil-4-nerolidilcatecol (**12**) e 2-O-benzil 4-nerolidilcatecol (**4**).

### 3.2.3.1 Tratamento de culturas de *Plasmodium falciparum* com derivados de 4-nerolidilcatecol e marcação metabólica com radioisótopo para análise de isoprenóides:

Para avaliar o efeito dos derivados de **1** sobre a biossíntese de isoprenóides foi utilizado o protocolo descrito em Rodrigues Goulart (2004). A cepa 3D7 utilizada no estudo foi cultivada conforme descrito no item 1.2.2 do material e métodos do capítulo 1. Culturas assincrônicas de *P. falciparum* foram tratadas ou não-tratadas por 30 h com **4** e **12**, na concentração de 4  $\mu$ M e marcadas metabolicamente com [1-(n)-<sup>3</sup>H]geranilgeranilpirofosfato ([<sup>3</sup>H]GGPP) (16.5 Ci/mmol, 3,125  $\mu$ Ci/mL; Amersham), por 18 h na presença das substâncias. Posteriormente, os diferentes estágios intraeritrocitários de *P. falciparum* foram purificados por um gradiente descontínuo de Percoll® de 40/70/80% (BRAUN-BRETON et al. 1986), o qual separa esquizontes (30 - 45 h), trofozoíto (20 - 30 h), anéis (1 - 20 h) e eritrócitos não-infectados. Os parasitos foram liofilizados e submetidos a extrações lipídicas com hexano (3 vezes; 0,5 mL cada). O pool de extrato foi secado com auxílio de um fluxo de nitrogênio e ressuspenso em 500  $\mu$ L de hexano. Cada extrato foi dividido em duas alíquotas para análise de dolicois ou cadeias isoprênicas ligadas à coenzima Q em HPLC.

### 3.2.3.2 Análise e purificação por RP-HPLC dos intermediários da biossíntese de isoprenóides em *Plasmodium falciparum*

Para análise de dolicois e ubiquinonas as alíquotas dos extratos hexânicos de cada estágio purificado do parasito (anel, trofozoíto e esquizonte) tratado e não tratado foram monitoradas para radioatividade. As amostras foram submetidas à RP-HPLC (*Reverse Phase High performance liquid chromatography*) em coluna Phenomenex Luna C18 (250 mm  $\times$  4.6 mm) acoplada a bomba Gilson HPLC 322 pump, conectada ao detector de UV Gilson 152 variable UV/visible. As frações purificadas foram coletadas pelo Gilson fraction collector FC203B e o programa UNIPPOINT™ System Software foi utilizado para analisar os cromatogramas obtidos.

Para análise de dolicois o gradiente de eluição utilizado foi: MeOH/H<sub>2</sub>O (9:1, v/v) (solvente A) e Hex/i-PrOH/MeOH (1:1:2, v/v/v) (solvent B). Realizou-se um gradiente linear variando de 5% a 100% do solvente B, num período de 25 min acrescidos de 5 min finais apenas com solvente B. O eluente foi monitorado à 210 nm sob fluxo de 1,5 mL/minuto. Frações de 0,5 min foram coletadas, às quais depois da evaporação do solvente foi adicionado líquido de cintilação e a radioatividade foi monitorada pelo número de cpm (contagem por minuto) em contador *Beckman 5000 $\beta$ -radiation scintillation*. Foram utilizados como padrão soluções de dolicois de 11 e 12 unidades isoprênicas a 100  $\mu$ M (RODRIGUES GOULART et al. 2004).

Para análise das cadeias de ubiquinonas os extratos hexânicos foram secados, ressuspendidos em MeOH, e coinjetados com os padrões Q<sup>8</sup> e menaquinone. Um sistema isocrático com MeOH/EtOH (50:50, v/v) foi utilizada em um fluxo de 1,0 mL/min com frações sendo coletadas em intervalos de 0,5 min. A eluição foi detectada a 275 nm. Após a evaporação dos solventes foi adicionado líquido de cintilação às frações purificadas e estas foram monitoradas quanto à radioatividade pela contagem de cpms em contador *Beckman 5000 $\beta$ -radiation scintillation* (TONHOSOLO et al. 2010).

A análise estatística comparativa das áreas dos picos provenientes dos cromatogramas de HPLC de extratos hexânicos de culturas de *P. falciparum* tratadas *versus* não-tratadas com derivados de **1**, foi realizada para dolicois e ubiquinonas. A fim de determinar os possíveis efeitos inibitórios das substâncias durante o tratamento, o grau de inibição foi estimado para cada metabólito analisado (dolicois e ubiquinonas).

Após avaliar a normalidade da população, o *test-t Student* foi aplicado aos dados, adotando como hipótese nula (H<sub>0</sub>) a igualdade das médias entre as populações dos parasitas não-tratados (controle) e parasitas tratados (limites de confiança de 95%). A média de inibição foi estimada com uma significância de 95% para cada fase do experimento.

### 3.2.3.3 Tratamento de culturas de *Plasmodium falciparum* com derivados de **1** e marcação metabólica para análise da inibição da síntese de proteínas

Com a finalidade de observar a possível inibição da síntese global de proteínas pelos derivados de **1**, culturas assincrônicas de *P. falciparum* foram tratadas ou não-tratadas por 48 h com **4** e **12**, e marcadas nas últimas 18 h com  $[1-^{14}\text{C}]\text{CH}_3\text{C}_2\text{Na}$  (acetato de sódio), que é incorporado em todas as proteínas no metabolismo primário (OLSZEWSKI et al. 2011). Posteriormente, os diferentes estágios intraeritrocitários de culturas de *P. falciparum* foram purificados como mencionado acima, para as análises em gel de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio). Após a purificação, cada estágio (anel, trofozoíta e esquizonte) foi lisado com o dobro de seu volume em uma solução de 10 mM de Tris-HCl pH 7.2, 150 mM de NaCl, 2% de Triton X-100 (v/v), 0.2 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), 5 mM de iodoacetamida, 1 mM de N-(p-tosil-lisina) clorometilcetona (TLCK) e 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de leupeptina.

Após a incubação por 15 min a 4°C, os lisados foram centrifugados a 10.000 g por 30 min e os sobrenadantes foram estocados em nitrogênio líquido para a análise posterior em gel de eletroforese (SDS-PAGE).

### 3.2.3.4 Gel de eletroforese em poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

SDS-PAGE foi realizado com um gel de 12,5% conforme descrito por Laemli (1970). As proteínas extraídas dos estágios de anel, trofozoíta e esquizonte tratados e não-tratados com **4** e **12** foram dissolvidos em tampão SDS e aplicados em cada poço do gel para análise. Após a corrida, o gel foi incubado com *Amplify* (Amersham) por 40 min, secado e exposto com um filme Kodak X-Omat (Amersham) a -70°C por 60 dias. Decorrido este período, a auto-radiografia foi revelada.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, alguns dos compostos que apresentaram atividade inibitória na proliferação de *P. falciparum in vitro* e *P. berghei in vivo* foram testados frente a alvos moleculares prioritários do *Plasmodium* através de ensaios químicos e bioquímicos na tentativa de se elucidar seus possíveis mecanismos de ação. Diante da grande variedade de alvos moleculares que tem sido apresentada para o *Plasmodium*, priorizamos dois alvos que possivelmente estariam relacionados com a natureza química dos compostos: inibição da formação de hemozoína e via de biossíntese de isoprenóides.

Os alcalóides indólicos foram direcionados para testes de inibição de hemozoína pelas características químicas da molécula (planaridade do sistema heterocíclico com nitrogênios básicos, figura 5) e evidências na literatura da interação de alcalóides indólicos planares com hemozoína (EGAN 2008; CHONG e SULIVAN 2003; LAVRADO et al. 2008), conforme será discutido na próxima seção. O anel aromático planar e a cadeia lateral alquil apolar dos derivados de 4-nerolidilcatecol também são indicativos de uma possível interação como o grupo heme (EGAN 2008).

Os derivados de 4-nerolidilcatecol (figura 4) foram direcionados para testes de inibição da síntese de isoprenóides em *P. falciparum* pela similaridade da cadeia lateral alquil (nerolidil) com alguns intermediários dessa via metabólica (figura 13) e também evidências da literatura (RODRIGUES-GOULART et al. 2004) indicando que terpenos semelhantes ao 4-nerolidilcatecol (figura 18) inibiram a biossíntese de alguns intermediários da via dos isoprenóis conforme será discutido na seção 3.3.2 deste capítulo.

#### 3.3.1 Inibição da formação de hemozoína pelos alcalóides indólicos e derivados de 4-nerolidilcatecol

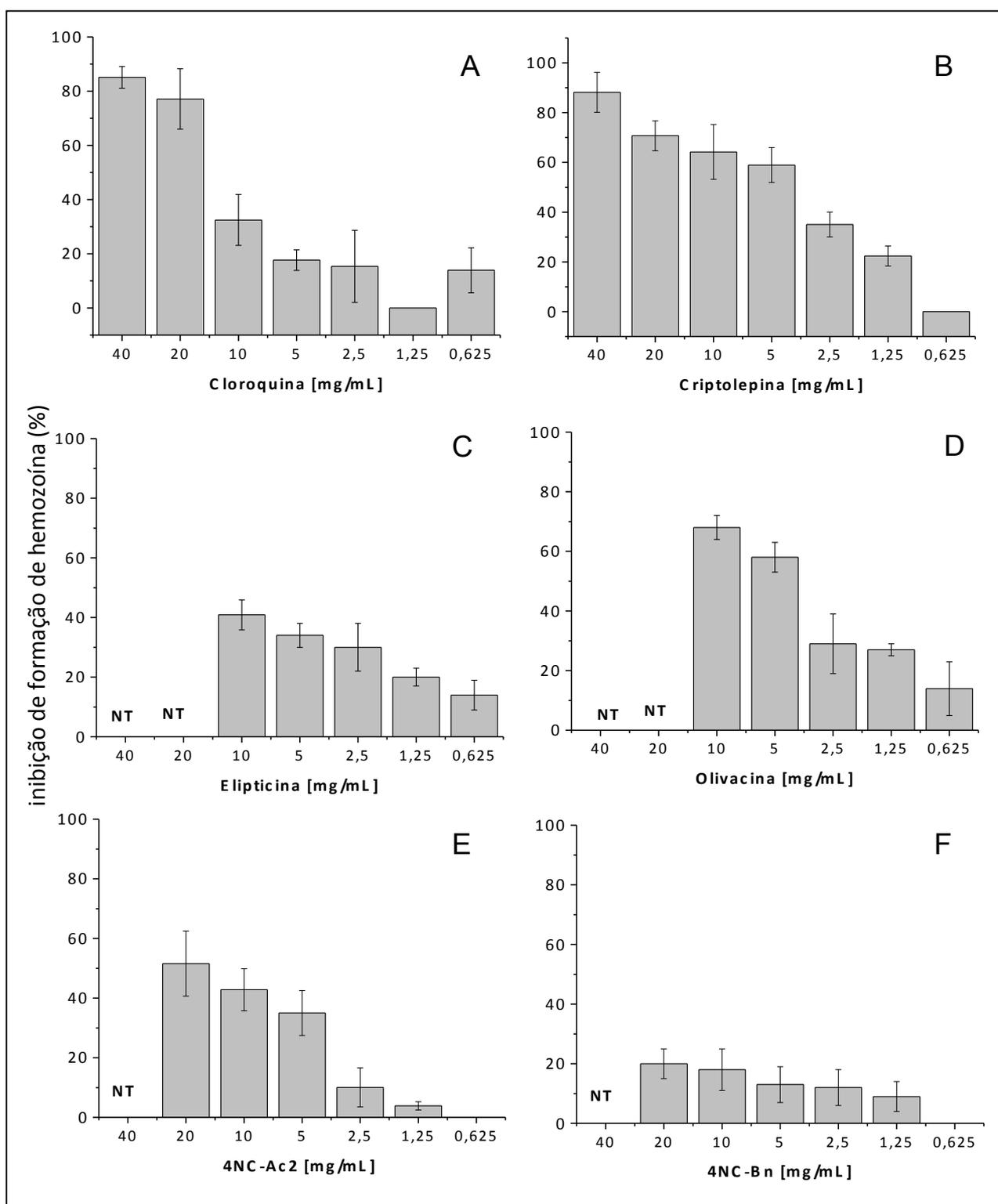
Os alcalóides indólicos elipticina (**9**), olivacina (**10**) e triflato de criptolepina (**11a**) juntamente com os compostos semi-sintéticos 2-O-benzil 4-nerolidilcatecol (**4**) e O,O-diacetil-4-nerolidilcatecol (**12**) foram avaliados quanto

a sua capacidade de inibir a formação de hemozoína. Dos alcalóides indólicos estudados *in vitro* no primeiro capítulo (tabela 6), **9,10** e **11a** foram os únicos que tinham quantidade suficiente de massa para estes testes de mecanismo de ação. Da mesma forma, dos derivados de 4-nerolidilcatecol, **4** e **12** eram os que haviam apresentado boa atividade antimalárica *in vitro* (tabela 6) e que estavam disponíveis em quantidade suficiente de massa para os testes de mecanismo de ação.

Foi utilizado o protocolo *in vitro* químico que mimetiza o ambiente *in vivo* do vacúolo digestivo do parasito, onde o heme resultante da degradação da hemoglobina é polimerizado para formação de hemozoína (NCOKAZI e EGAN 2005). Nos poços controle da placa de teste, onde as condições são favoráveis a formação de hemozoína, a densidade óptica é considerada como 100% de formação de hemozoína. Quanto menor a quantidade de hemozoína formada nos poços contendo as substâncias testadas, maior é a capacidade dessas substâncias de inibir a formação de hemozoína. Neste protocolo a cloroquina é utilizada como padrão positivo de atividade (AGUIAR et al. 2012). Foram realizados três experimentos independentes, onde cada amostra foi testada em até sete concentrações em triplicata. Diferenças significativas em relação ao controle negativo foram consideradas quando  $p \leq 0,05$ .

Todos os alcalóides indólicos apresentaram significativa inibição da formação de hemozoína *in vitro* (figura 14). Triflato de criptolepina apresentou inibição de hemozoína semelhante à cloroquina na concentração mais alta de 40 mg/mL, e inibição superior à esta droga nas demais concentrações testadas.

As substâncias naturais elipticina e olivacina não foram testadas nas concentrações de 40 e 20 mg/mL por problemas na solubilização dessas substâncias nestas concentrações, porém, mesmo na concentração de 10 mg/mL elipticina e olivacina inibiram a formação de hemozoína em 40% e 70% respectivamente. Em todos os alcalóides indólicos foi observada uma inibição da formação de hemozoína dependente da concentração.



**Figura 14:** Inibição da formação de hemozoína pela cloroquina(A), triflato de criptolepina (B), elipticina (C), olivacina (D), 1,2-O,O-diacetil 4-nerolidilcatecol (E) e 2-O-benzil 4-nerolidilcatecol (F). Diferenças significativas em relação ao controle negativo foram consideradas quando  $p \leq 0,05$ .

Vários tipos de drogas antimaláricas são conhecidos por exibir sua atividade antimalárica através do aumento da concentração do heme livre (tóxico para o *Plasmodium*) pela inibição da formação de hemozoína. Entre as classes químicas com esta capacidade estão as quinolinas, os azóis, isonitrilas, xantonas, azul-de-metileno e seus derivados. A cloroquina é a droga clássica conhecida por inibir a formação de hemozoína. A interação entre a cloroquina e o sistema eletrônico da hematina conduz a formação de *adutos*. O heme livre e o complexo heme-cloroquina provoca estresse oxidativo que leva a peroxidação dos lipídeos de membrana do parasito, danos no DNA, oxidação de proteínas e finalmente a morte do parasito (KUMAR et al. 2007; THOME et al. 2013).

Nos últimos anos algumas novas substâncias que apresentam atividade antimalárica tem demonstrado exercer seu efeito sobre o *Plasmodium* pelo aumento da concentração do heme livre. Entre estas substâncias estão os alcalóides indólicos de origem natural e semi-sintética. A criptolepina isolada de *Cryptolepis sanguinolenta* é a principal representante desta classe, e tem sido estudada com várias técnicas quanto ao potencial inibidor de formação de hemozoína. Wrigth et al. (2001) estudou vários de seus derivados e análogos, sendo 2,7-dibromocriptolepina a substância com maior potencial inibidor de formação de hemozoína. Estas substâncias também apresentaram alta atividade antimalárica *in vitro* frente a cepas de *P. falciparum* sensíveis e resistentes.

Lavrado et al (2011) produziram vários derivados de criptolepina que juntamente com o composto original apresentaram alta afinidade de ligação com o heme e conseqüente inibição de formação de hemozoína. Nossos resultados confirmam os dados da literatura em relação a este mecanismo de ação proposto para criptolepina. Conforme apresentado na figura 14, criptolepina apresentou alto grau de inibição de formação de hemozoína, sendo esta inibição superior a cloroquina em algumas concentrações.

Elipticina (**9**) e olivacina (**10**) são alcalóides naturais que apresentam alta analogia estrutural com criptolepina (**11a**). O sistema poliheterocíclico planar de **9** e **10** apresentam diferenças estruturais em relação á **11a** pela adição de mais

uma metila. Diferenças estereoeletrônicas também podem ser observadas devido à localização do nitrogênio não-indólico (figura 5). Estas características estruturais podem conferir a capacidade destas substâncias de interagir com o grupo heme e impedir a formação de hemozoína, conforme apresentado na literatura e confirmado pelos nossos dados. Uma das possíveis interações entre estes alcalóides indólicos e o grupo heme, seria às do tipo pi-stacking (interações de empilhamento), semelhante ao que acontece com o anel quinolínic da cloroquina (THOME et al. 2013). Ao estudar compostos antimaláricos com capacidade de inibir o crescimento do cristal de hemozoína *in vitro* (*inhibition heme crystal growth: ICG*), Chong e Sullivan (2003) demonstraram que elipticina apresentou um ótimo efeito inibitório sobre o crescimento do cristal de hemozoína (ICG,IC<sub>50</sub> = 7,9 µM), comparável a cloroquina (ICG,IC<sub>50</sub> = 4,3 µM) e melhor que a quinina (ICG,IC<sub>50</sub> = 17,1 µM).

Tem sido proposto que o mecanismo de ação antitumoral da elipticina está relacionado a capacidade de sua cadeia altamente planar causar danos no DNA por intercalação, dado o alto grau de afinidade entre as bases *in vitro*. A elipticina também inibiu topoisomerase II de células tumorais *in vitro* (MOODY et al. 2007). Recentemente, a formação de *adutos* covalentes de DNA mediados por oxidação da elipticina pelo citocromo p450 e peroxidase foi proposto como mais um possível mecanismo de ação antitumoral (KOTRBOVA et al. 2011). Dado que o *Plasmodium* apresenta algumas características de crescimento semelhante a células tumorais estes mecanismos de ação de elipticina também podem estar relacionados com sua ação no parasito.

O derivado de 4-nerolidilcatecol, **12** (figura 4) apresentou boa atividade inibitória de formação de hemozoína, com 50% de inibição na concentração de 20 mg/mL, e decaimento da atividade em função da diminuição da concentração. **4** (figura 4) apresentou baixos índices de inibição comparados aos demais compostos testados, com inibição máxima próximo a 20% na concentração mais alta testada. Na concentração de 40mg/mL estes compostos apresentaram problemas de solubilidade, não sendo possível testá-los nesta concentração.

O heme apresenta um caráter lipofílico semelhante aos derivados de **1**, o que pode favorecer a interação entre estas substâncias. É sugerido que a calda planar do **1** juntamente com a estabilidade conferida pelo grupo acetil à molécula (LIMA et al. 2013), tenham influenciado uma possível intercalação de **12** com a hemozoína em formação. Estudos mostram que os oxigênios da ponte endoperóxido da artemisinina tem alta afinidade com o ferro do grupo heme contribuindo para o seu efeito inibidor de hemozoína (MESSORI et al. 2003). Da mesma forma é possível que os oxigênios presentes em **12** também tenham tido esse efeito quelante ao ferro formando complexos. Outra possibilidade é que enquanto o anel aromático de **12** promove interações tipo *pi-stacking*, a cadeia lateral alquil interage com o heme por forças de Van der Waals. Essas possíveis interações com o heme/hemozoína mencionadas aqui são comuns em drogas que agem inibindo a formação de hemozoína (KUMAR 2007).

A atividade diminuída de **4** pode ser explicada pelo impedimento estérico do grupo substituinte benzil com tamanho maior que o grupo acetil de **12**. Esta diminuição de atividade também foi observada no mecanismo de ação relacionado à via de biossíntese de isoprenóides conforme discutido a seguir. Tais proposições precisam ser confirmadas por estudos de *docking* molecular e técnicas espectroscópicas.

### **3.3.2 Efeito dos derivados de 4-nerolidilcatecol sobre a via de biossíntese de isoprenóides e biossíntese de proteínas em *Plasmodium falciparum*.**

O efeito dos derivados de **1**, 2-O-benzil 4-nerolidilcatecol (**4**) e 1,2-O, O-diacetil 4-nerolidilcatecol (**12**) sobre a biossíntese de isoprenóides na cepa 3D7 de *P. falciparum* foi determinada pela marcação metabólica de parasitos tratados e não-tratados (4 µM de **4** e **12** por 36 h). O precursor radioativo utilizado para marcação metabólica foi [1-(n)-<sup>3</sup>H]geranilgeranilpirofosfato ([<sup>3</sup>H]GGPP). É bem comprovado que o alongamento das cadeias de GGPP pela adição de unidades de IPP sob ação das enzimas preniltransferases leva a formação de dolicois, sobretudo os de 12 unidades e as cadeias isoprênicas

ligadas ao anel benzoquinona. Estudos de marcação metabólica realizados pelo grupo do prof. Alejandro Katzin tem com provado que [<sup>3</sup>H]GGPP marca uma série de intermediários e produtos finais da via dos isoprenóides, incluindo dolicolóis e ubiquinonas (COUTO et al. 1999; D'ALEXANDRI et al. 2006; SUSSMANN et al. 2011; TONHOSOLO et al. 2009; TONHOSOLO et al. 2010).

A cepa 3D7 foi utilizada no estudo por ser a cepa melhor caracterizada bioquímica e geneticamente. Os extratos lipídicos de anéis, trofozoítas e esquizontes foram analisados em *RP*-HPLC para dolicolóis de 11 e 12 unidades isoprenicas e ubiquinonas.

Nos plasmódios os isoprenóides são sintetizados a partir da via MEP localizada no interior do apicoplasto conforme apresentado na revisão de literatura. Esta via metabólica e sua localização celular singular é muito diferente (enzimas e intermediários) das vias que sintetizam estes compostos nos mamíferos, o que a torna um importante alvo para novas drogas. Nenhum dos antimaláricos utilizados hoje na rotina clínica apresenta a inibição da via de biossíntese de isoprenóides como mecanismo de ação (JORDAO et al. 2011).

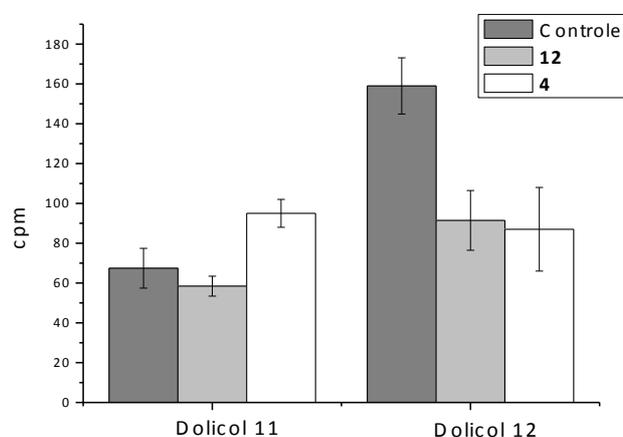
Tem sido demonstrado através de estudos metabólicos que o *P. falciparum* biossintetiza vários intermediários e produtos finais da via dos isoprenóides como colesterol, carotenóides, vitamina E, ubiquinona, menaquinona, dolicolóis além de proteínas geraniladas e farnesilada (SUSSMANN et al. 2011; TONHOSOLO et al. 2009; TONHOSOLO et al. 2010; VAN DER MEER e HIRSCH 2012). Tais compostos apresentam funções essenciais à sobrevivência do plasmódio, sendo relacionada inibição da biossíntese deles por substâncias com à morte do parasito.

A figura 15 apresenta os níveis de radioatividade (cpm) observadas nas frações contendo os dolicolóis 11 e 12 do extrato hexânico obtido de culturas no estágio esquizonte tratadas e não-tratadas com os derivados de **1**. A quantificação da radioatividade (cpm) das frações dos testes (tratados) foi comparada com as do controle não-tratado, este último sendo considerado como 100% de biossíntese pela incorporação do precursor radioativo. A análise estatística aplicada foi descrita no material e métodos.

As substâncias **4** e **12** apresentaram um efeito inibitório significativo sobre a biossíntese de dolicolol 12 nos parasitos testados, com inibição de 41% e 45% respectivamente. Não foi observada inibição significativa na biossíntese

de dolicol 11 nas culturas tratadas com **4** e **12**. O fato de nossos experimentos não terem demonstrado efeito inibitório dos compostos sobre a biossíntese de dolicol 11 pode estar relacionado à baixa capacidade do [<sup>3</sup>H]GGPP para marcar metabolicamente este intermediário como descrito por Couto et al. (1999), e confirmado pelos baixos valores de cpm para dolicol 11 observados na figura 15. Não houve inibição significativa da síntese de dolicolis nos estágios de anel e trofozoíta.

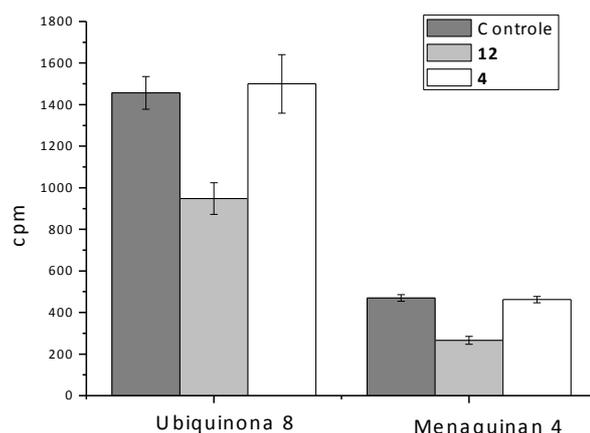
Ancoras de glicosilfosfatidilinositol representam a maior glicosilação de proteínas nos estágios intra-eritrocitários de *P. falciparum*. Ancoras de glicoproteínas N-ligadas requerem dolicol fosfato (dolicol-P) e dolicol pirofosfato (dolicol-PP) como carreadores de diferentes constituintes monossacarídeos. Estas substâncias terpenicas estão diretamente relacionadas com o mecanismo de diferenciação dos estágios intraeritrocitários assexuados de *P. falciparum*. A inibição deste processo também já foi evidenciada por outras substâncias que inibiram o crescimento do *P. falciparum* como a mevastatina (COUTO et al. 1999; JORDAO et al. 2011).



**Figura 15: Níveis de radioatividade das frações contendo dolicolis 11 e 12 do extrato hexânico obtido de culturas no estágio esquizonte tratadas e não-tratadas por 48 h com 4,0  $\mu$ M de 1,2-O,O-diacetil 4-nerolidilcatecol (12) e 2-O-benzil 4-nerolidilcatecol (4) após purificação por HPLC. Marcação com [1-(n)-<sup>3</sup>H]geranilgeranilpirofosfato.**

A biossíntese das quinonas preniladas ubiquinona e menaquinona também foi avaliada utilizando a incorporação do mesmo precursor radioativo dos dolicolis. Quanto à biossíntese das cadeias isoprênicas ligadas ao anel

benzoquinona os resultados das cpm das frações correspondentes ao tempo de retenção de ubiquinona-8 e menaquinona-4 dos extratos lipídicos de esquizontes tratados e não-tratados com **4** e **12**, estão apresentados na figura 16. O derivado **12** inibiu significativamente a biossíntese de ubiquinona em 36% e biossíntese de menaquinona em 41%. Quando as culturas foram tratadas com a substância **4** não houve diferenças significativas na biossíntese das quinonas preniladas em relação ao controle não-tratado, considerando-se 0% de inibição. Semelhante ao observado para os dolicoís, não houve inibição significativa na síntese ubiquinona-8 e menaquinona-4 nos estágios de anel e trofozoíta (dados não mostrados). Dos compostos testados aqui, **12** foi o único capaz de inibir significativamente a síntese de ubiquinona e menaquinona com índices de inibição de 36% e 41% respectivamente (Figura 16).



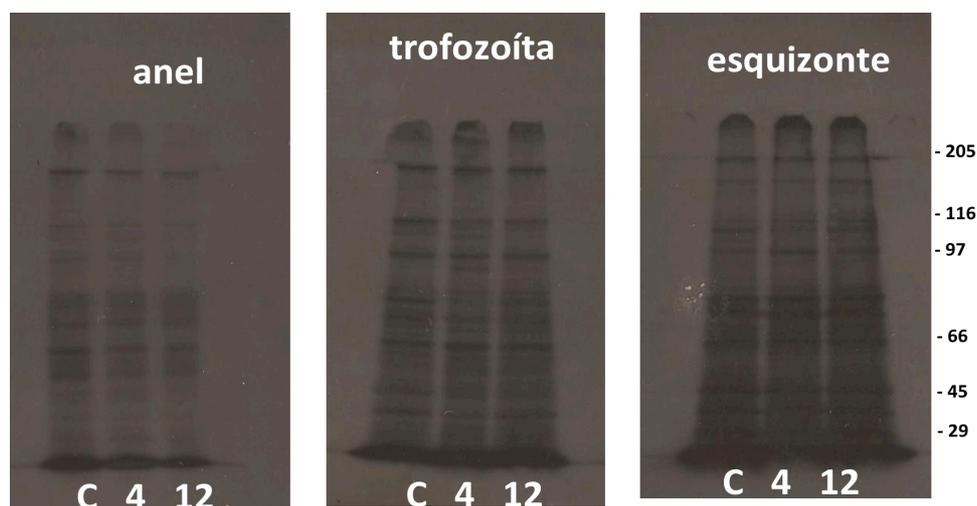
**Figura 16: Níveis de radioatividade das frações contendo ubiquinona 8 e menaquinona-4 do extrato hexânico obtido de culturas no estágio esquizonte tratadas e não-tratadas por 48 h com 4,0  $\mu$ M de 1,2-O,O-diacetil 4-nerolidlcatecol (**12**) e 2-O-benzil 4-nerolidlcatecol (**4**) após purificação no por HPLC. Marcação com [1-(n)-<sup>3</sup>H]geranilgeranilpirofosfato,**

Ubiquinona ou coenzima Q é um importante carreador de elétrons que é ativamente sintetizado na mitocôndria do *Plasmodium* spp.. É sugerido que a coenzima Q aja como um antioxidante para reagir contra os diferentes danos oxidativos impostos pelo sistema imune do hospedeiro (DE MACEDO et al. 2002; NOWICKA e KRUK 2010). Vitamina K2 ou menaquinona é uma clássica vitamina lipossolúvel que regula algumas vias metabólicas. Tonhosollo et al. (2010), demonstrou a biossíntese desta vitamina pelo *P. falciparum* por

marcação radioativa dos precursores diretos. A inibição da biossíntese de menaquinona produzida pela droga experimental Ro 48-8071 (1,4-dihidroxi-naftoato), uma conhecida inibidora de preniltransferase, resultou na diminuição do crescimento do parasito *in vitro*.

Para análise da possível interferência na síntese global de proteínas, as culturas tratadas e não-tratadas com **4** e **12** foram marcadas com [1-<sup>14</sup>C] AcONa. O acetato é um importante precursor na síntese de vários aminoácidos que são posteriormente incorporados às proteínas no metabolismo primário do parasita (OLSZEWSKI e LLINÁS 2011). Uma vez que as proteínas estejam marcadas com [1-<sup>14</sup>C] AcONa, após a extração e realização do gel de SDS-PAGE, a radiação proporcional a quantidade de proteínas pode ser revelada em um papel filme conforme descrito no materiais e métodos.

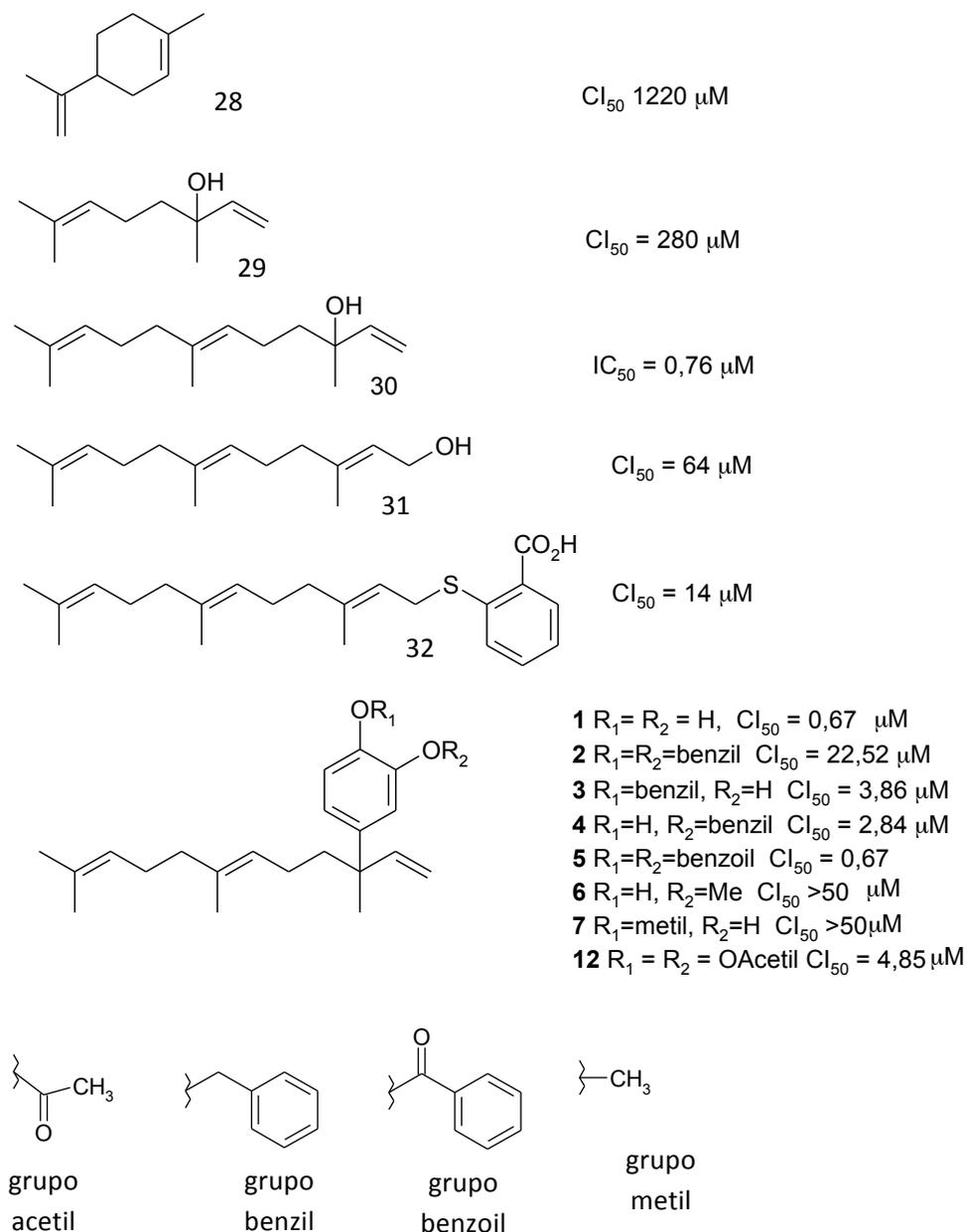
A análise do gel de SDS-PAGE de proteínas de anéis, trofozoítas e esquizontes de culturas marcadas com [1-<sup>14</sup>C] AcONa e tratadas e não-tratadas com **4** e **12**, estão apresentadas na figura 17. A intensidade das bandas demonstra que não houve inibição na síntese global de proteínas pelos derivados de **1**, sendo a intensidade das bandas do controle semelhante a intensidade das bandas dos testes (tratados) em todos os estágios parasitários.



**Figura 17:** Imagem em papel fotográfico de gel de SDS-PAGE de proteínas obtidos de culturas de *P. falciparum* no estágio anel, trofozoíta e esquizonte tratadas e não-tratadas por 36 h com 4,0 µM dos derivados de 4-nerolidilcatecol e metabolicamente marcadas nas últimas 12 h com [1-<sup>14</sup>C] AcONa. C: controle não tratado; 12: tratamento com 1,2-O,O-diacetil 4-nerolidilcatecol; 4: tratamento com 2-O-benzil 4-nerolidilcatecol. Os pesos moleculares padrão estão indicados à direita.

Rodrigues-Goulart et al. (2004) demonstrou que os monoterpênicos nerolidol, farnesol e linalol (figura 18) exerceram forte inibição da biossíntese de cadeias isoprênicas ligadas ao anel benzoquinona no estágio de esquizonte, e todos estes terpenos inibiram a biossíntese de dolicois nos estágios de trofozoíto e esquizontes quando o precursor [1-(n)-<sup>3</sup>H]-farnesil-pirofosfato ([<sup>3</sup>H]FPP) foi utilizado como precursor. O nerolidol possui a mesma estrutura da cadeia lateral dos derivados de **1** (figura 18), que também é semelhante aos intermediários da via dos isoprenóides (figura 13), e essa cadeia lateral deve ser responsável pelos efeitos inibitórios observados aqui. A semelhança dos terpenos testados por Rodrigues-Goulart et al. (2004) com as estruturas de **1** e derivados (figura 18) foi a base para a abordagem metodológica utilizada aqui.

A atividade biológica dos derivados de **1** se dá após a penetração dos compostos na célula, o que é facilitado pela sua cadeia terpênica de hidrocarboneto com 15 carbonos, altamente lipofílica, que apresenta afinidade pelos fosfolípidos de membrana conforme discutidos em trabalhos anteriores (LIMA et al. 2013). Vários terpenos naturais, semi-sintéticos e sintéticos tem sido testados para atividade antimalárica *in vitro*, alguns dos quais também tem demonstrado boa ou razoável atividade *in vivo*, porém um número muito reduzido tem sido estudado ao nível de um proposto mecanismo de ação na via dos isoprenóides (MOTA et al. 2012; RAMALHETE et al. 2011; ROCHA E SILVA et al. 2013; SCHMIDT et al. 2012). Os níveis de inibição provocados pelos derivados de **1** foram considerados bons, pois ocorreram quando estes compostos foram testados em concentrações abaixo da IC<sub>50</sub> que é uma dose média da ação da droga sobre o parasito, e sugerem que este é um dos possíveis mecanismos ação de **1** para levar o *P. falciparum* à morte.



**Figura 18: Estrutura dos terpenos limoneno (28), linalol (29), nerolidol (30), farnesol (31) e ácido S-farnesiltiosalicílico (32) testados em Rodrigues-Goulart et al. (2004), com as  $CI_{50}$  frente a cepa 3D7 de *P. falciparum* do lado direito, em comparação com 4-nerolidilcatecol (1) e seus derivados semissintéticos 2-7 testados em Pinto et al. (2009), e 12 apresentado na tabela 6, com as  $CI_{50}$  frente a cepa K1 de *P. fallciparum*. Abaixo os grupos radicais adicionados aos derivados semi-sintéticos de 1.**

### 3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS DO CAPÍTULO

Mecanismos fisiológicos do parasito relacionados à sua estrutura e função têm sido bem explorados para o desenvolvimento de novas drogas antimaláricas. No presente trabalho testamos cinco de nossas principais substâncias frente a dois processos metabólicos essenciais a sobrevivência do parasito: formação de hemozoína e via de biossíntese de isoprenóides.

A elipticina e olivacina apresentaram alto grau de inibição de formação de hemozoína, o que já era de se esperar, dadas as suas estruturas lanares nitrogenadas e semelhança com o alcalóide criptolepina, cuja atividade inibitória de formação de hemozoína já foi amplamente estudada em outros trabalhos e confirmada aqui. Essa ação inibitória é proposta como um dos mecanismos de ação antimaláricos para estes compostos, o que pode ser extensivo à classe dos alcalóides indólicos planares. A inibição da biossíntese de isoprenóides é sugerida como o principal mecanismo de ação antimalárico dos derivados de **1**, sendo o derivado **12** considerado o mais ativo. A capacidade de **12** de inibir a formação de hemozoína pode estar contribuindo diretamente para seu efeito sobre os parasitos. Esta é a primeira vez que substâncias oriundas de plantas amazônicas são estudadas ao nível dos seus mecanismos de ação antimaláricos.

# Conclusão

---

#### 4 CONCLUSÃO

- Os estudos de atividade antimalárica *in vitro* confirmaram que produtos naturais de plantas popularmente tidas como antimaláricas são potencialmente ativas contra o parasito.
- Os testes *in vitro* em cultura limitada de *P. vivax* realizados continuam em fase a aprimoramento do protocolo e serviram para indicar que os isolados de *P. vivax* circulantes na região Amazônica são suscetíveis às substâncias testadas.
- O 4-nerolidilcatecol teve pouca atividade antimalária *in vivo*, porém as modificações moleculares conferiram maior estabilidade química e aumentaram a atividade antimalárica *in vivo* do derivado diacetilado comparado ao produto natural.
- Elipticina foi a substância que apresentou melhor atividade inibitória sobre as formas sanguíneas de *P. berghei in vivo* com inibição de 100% da parasitemia na dose de 50 mg/kg/dia, sendo considerado o composto mais promissor quanto a suas atividades *in vitro* e *in vivo*.
- Alcalóides indólicos e derivados de 4-nerolidilcatecol apresentaram efeito inibitório na formação de hemozoína *in vitro*, considerando-se esta atividade um de seus mecanismos de ação. Criptolepina e olivacina foram as substâncias mais ativas dentre as testadas para este mecanismo de ação.
- 1,2-O,O-diacetil 4-nerolidilcatecol exerceu um importante efeito inibitório na via de biossíntese de isoprenóides em *P. falciparum in vitro* onde foi observada uma diminuição direta na produção de dolicois e ubiquinonas pelo parasita. Inibição na via de biossíntese de isoprenóides é um dos mecanismos de ação proposto para esta classe de substância.
- Com base nos resultados *in vitro*, *in vivo* e estudos de mecanismo de ação realizados aqui, é possível concluir que os alcalóides indólicos elipticina e olivacina e derivados de 4-nerolidilcatecol apresentaram grande potencial para terem desenvolvimento continuado como futuros antimaláricos.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMI, Y.L. Estudo In Vivo e In Vitro da Potencial Atividade Antimalárica de *Pothomorphe peltata* e *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. *Parasitologia*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1995.

ADITYA, N.P.; VATHSALA, P.G.; VIEIRA, V.; MURTHY, R.S.; and SOUTO, E.B. Advances in nanomedicines for malaria treatment. *Adv Colloid Interface Sci*, 201-202:1-17, 2013.

AGUIAR, A.C.; ROCHA, E.M.; SOUZA, N.B.; FRANCA, T.C.; and KRETTLI, A.U. New approaches in antimalarial drug discovery and development: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107(7):831-45, 2012.

AGUIAR, A.C.C.; SANTOS, R.M.; FIGUEIREDO, F.J.B.; CORTOPASSI, W.A.; PIMENTEL, A.S.; FRANÇA, T.C.C.; MENEGHETTI, M.R.; and KRETTLI, A.U. Antimalarial Activity and Mechanisms of Action of two Novel 4-Aminoquinolines against Chloroquine-Resistant Parasites. *Plos One*, 7(5):1-9, 2012.

AMORIM, C.Z.; FLORES, C.A.; GOMES, B.E.; MARQUES, A.D.; and CORDEIRO, R.S.B. Screening for antimalarial activity in the Genus *Pothomorphe*. *J Ethnopharmacol*, 24:101-106, 1988.

AMORIM, C.Z.; GOMES, B.E.; FLORES, C.A.; and CORDEIRO, R.S.B. Antimalarial activity screening from plants of the Genus *Pothomorphe*. *Braz J Med Biol Res*, 19:569, 1986.

AMORIM, R.C.N., and POHLIT, A.M. *Picrolemma sprucei* Hook. f.: uso tradicional, princípios ativos e seus derivados semi-sintéticos, exploração comercial e econômica. *Fitos*, 1(14):19-26, 2006.

AMORIM, R.C. Contribuições para o conhecimento da composição química e atividade biológica de infusões, extratos e quassinóides obtidos da *Picrolemma sprucei* Hook. f. (Simaroubaceae). *Biotecnologia*. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2009.

ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDAO, M.G.; NOGUEIRA, F.; ROSARIO, V.E.; and KRETTLI, A.U. *Ampeloziziphus amazonicus* Ducke (Rhamnaceae), a medicinal plant used to prevent malaria in the Amazon Region, hampers the development of *Plasmodium berghei* sporozoites. *Int J Parasitol*, 38(13):1505-11, 2008.

ANDRADE-NETO, V.F.; GOULART, M.O.; DA SILVA FILHO, J.F.; DA SILVA, M.J.; PINTO MDO, C.; PINTO, A.V.; ZALIS, M.G.; CARVALHO, L.H.; and KRETTLI, A.U. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, beta-lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. *Bioorg Med Chem Lett*, 14(5):1145-9, 2004.

ANDRADE-NETO, V.F.; POHLIT, A.M.; PINTO, A.C.; SILVA, E.C.; NOGUEIRA, K.L.; MELO, M.R.; HENRIQUE, M.C.; AMORIM, R.C.; SILVA, L.F.; COSTA, M.R.; NUNOMURA, R.C.; NUNOMURA, S.M.; ALECRIM, W.D.; ALECRIM, M.; CHAVES, F.C.; and VIEIRA, P.P. In vitro inhibition of Plasmodium falciparum by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102(3):359-65, 2007.

ANDRADE-NETO, V.F.; POHLIT, A.M.; PINTO, A.C.; SILVA, E.C.; NOGUEIRA, K.L.; MELO, M.R.; HENRIQUE, M.C.; AMORIM, R.C.; SILVA, L.F.; COSTA, M.R.; NUNOMURA, R.C.; NUNOMURA, S.M.; ALECRIM, W.D.; ALECRIM, M.G.; CHAVES, F.C.; and VIEIRA, P.P. In vitro inhibition of Plasmodium falciparum by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102(3):359-65, 2007.

ANDRADE, A.A.; DE PILLA VAROTTI, F.; DE FREITAS, I.O.; DE SOUZA, M.V.; VASCONCELOS, T.R.; BOECHAT, N.; and KRETTLI, A.U. Enhanced activity of mefloquine and artesunic acid against Plasmodium falciparum in vitro and P. berghei in mice by combination with ciprofloxacin. *Eur J Pharmacol*, 558(1-3):194-8, 2007.

BASSO, L.A.; DA SILVA, L.H.; FETT-NETO, A.G.; DE AZEVEDO, W.F., JR.; MOREIRA IDE, S.; PALMA, M.S.; CALIXTO, J.B.; ASTOLFI FILHO, S.; DOS SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.; and SANTOS, D.S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100(6):475-506, 2005.

BERTANI, S.; BOURDY, G.; LANDAU, I.; ROBINSON, J.C.; ESTERRE, P.; and DEHARO, E. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *J Ethnopharmacol*, 98(1-2):45-54, 2005.

BESSELIÈVRE, R., and HUSSON, H.P. Syntheses in the ellipticine-olivacine series: A possible biogenetic model. *Tetrahedron*, 37(1):241-246, 1981.

BRANDAO, M.G.; GRANDI, T.S.; ROCHA, E.M.; SAWYER, D.R.; and KRETTLI, A.U. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. *J Ethnopharmacol*, 36(2):175-82, 1992.

BRANDAO, M.G.; KRETTLI, A.U.; SOARES, L.S.; NERY, C.G.; and MARINUZZI, H.C. Antimalarial activity of extracts and fractions from Bidens pilosa and other Bidens species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. *J Ethnopharmacol*, 57(2):131-8, 1997.

BRASIL, L.W.; AREAS, A.L.; MELO, G.C.; OLIVEIRA, C.M.; ALECRIM, M.G.; LACERDA, M.V.; O'BRIEN, C.; OELEMANN, W.M.; and ZALIS, M.G. Pfatp6 molecular profile of Plasmodium falciparum isolates in the western Brazilian Amazon. *Malar J*, 11:111, 2012.

BRAUN-BRETON, C.; JENDOUBI, M.; BRUNET, E.; PERRIN, L.; SCAIFE, J.; and PEREIRA DA SILVA, L. In vivo time course of synthesis and processing of

major schizont membrane polypeptides in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 20(1):33-43, 1986.

BURROWS, J.N.; BURLLOT, E.; CAMPO, B.; CHERBUIN, S.; JEANNERET, S.; LEROY, D.; SPANGENBERG, T.; WATERSON, D.; WELLS, T.N.; and WILLIS, P. Antimalarial drug discovery - the path towards eradication. *Parasitology*, 141(1):128-39, 2013.

CALDERON, L.A.; SILVA-JARDIM, I.; ZULIANI, J.P.; SILVA, A.A.; CIANCAGLINI, P.; PEREIRA DA SILVA, L.H.; and STÁBELI, R.G. Amazonian Biodiversity: A View of Drug Development for Leishmaniasis and Malaria. *J. Braz. Chem. Soc.*, 20(6):1011-1023, 2009.

CALDERON, L.A.; SILVA-JARDIM, S.; ZULIANI, J.P.; ALMEIDA, A.; CIANCAGLINI, P.; PEREIRA-DA-SILVA, L.H.; and STÁBELI, R.G. Amazonian Biodiversity: A View of Drug Development for Leishmaniasis and Malaria. *J. Braz. Chem. Soc.*, 20(6):1011-1023, 2009.

CAMARGO, M.R.M. Avaliação da atividade antimalárica e antimicrobiana de *Geissospermum argenteum* Woodson e *Minquartia guianensis* Aubl coletadas em Roráima. *Programa de Pós-graduação em recursos naturais*. Boa Vista: Universidade Federal de Roráima, 2011. pp. 103.

CAMRGO, M.R.M. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA E ANTIMICROBIANA DE *Geissospermum argenteum* Woodson E *Minquartia guianensis* Aubl COLETADAS EM RORAIMA. *Programa de Recursos Naturais*. Boa Vista: Universidade Federal de Roraima, 2011. pp. 103.

CARLTON, J.M.; SINA, B.J.; and ADAMS, J.H. Why is *Plasmodium vivax* a neglected tropical disease? *PLoS Negl Trop Dis*, 5(6):e1160, 2011.

CARVALHO, L.H.; BRANDAO, M.G.; SANTOS-FILHO, D.; LOPES, J.L.; and KRETTLI, A.U. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied in vivo in *Plasmodium berghei*-infected mice and in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture. *Braz J Med Biol Res*, 24(11):1113-23, 1991.

CARVALHO, L.H., and KRETTLI, A.U. Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined molecules. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 86 Suppl 2:181-4, 1991.

CASSERA, M.B.; GOZZO, F.C.; D'ALEXANDRI, F.L.; MERINO, E.F.; DEL PORTILLO, H.A.; PERES, V.J.; ALMEIDA, I.C.; EBERLIN, M.N.; WUNDERLICH, G.; WIESNER, J.; JOMAA, H.; KIMURA, E.A.; and KATZIN, A.M. The methylerythritol phosphate pathway is functionally active in all intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, 279(50):51749-59, 2004.

CHAIJAROENKUL, W.; BANGCHANG, K.N.; MUNGTHIN, M.; and WARD, S.A. In vitro antimalarial drug susceptibility in Thai border areas from 1998-2003. *Malar J*, 4:37, 2005.

CHEHUAN, Y.F.; COSTA, M.R.; COSTA, J.S.; ALECRIM, M.G.; NOGUEIRA, F.; SILVEIRA, H.; BRASIL, L.W.; MELO, G.C.; MONTEIRO, W.M.; and LACERDA, M.V. In vitro chloroquine resistance for Plasmodium vivax isolates from the Western Brazilian Amazon. *Malar J*, 12:226, 2013.

CHONG, C.R., and SULLIVAN, D.J., JR. Inhibition of heme crystal growth by antimalarials and other compounds: implications for drug discovery. *Biochem Pharmacol*, 66(11):2201-12, 2003.

CIMANGA, K.; DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; and TURGER, C.A. In vitro and in vivo antiplasmodial activity of cryptolepine and related alkaloids from *Cryptolepis sanguinolenta*. *J Nat Prod*, 60(7):688-91, 1997.

COUTINHO, J.P.; AGUIAR, A.C.; SANTOS, P.A.; LIMA, J.C.; ROCHA, M.G.; ZANI, C.L.; ALVES, T.M.; SANTANA, A.E.; PEREIRA MDE, M.; and KRETTLI, A.U. *Aspidosperma* (Apocynaceae) plant cytotoxicity and activity towards malaria parasites. Part I: *Aspidosperma nitidum* (Benth) used as a remedy to treat fever and malaria in the Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108(8):974-82, 2013.

COUTO, A.S.; KIMURA, E.A.; PERES, V.J.; UHRIG, M.L.; and KATZIN, A.M. Active isoprenoid pathway in the intra-erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*: presence of dolichols of 11 and 12 isoprene units. *Biochem J*, 341 (Pt 3):629-37, 1999.

CRAVO, P., and ROSÁRIO, V. Aspectos de genética molecular da resistência aos fármacos antimaláricos, 2003.

CROWTHER, G.J.; NAPULI, A.J.; GILLIGAN, J.H.; GAGARING, K.; BORBOA, R.; FRANCEK, C.; CHEN, Z.; DAGOSTINO, E.F.; STOCKMYER, J.B.; WANG, Y.; RODENBOUGH, P.P.; CASTANEDA, L.J.; LEIBLY, D.J.; BHANDARI, J.; GELB, M.H.; BRINKER, A.; ENGELS, I.H.; TAYLOR, J.; CHATTERJEE, A.K.; FANTAUZZI, P.; GLYNNE, R.J.; VAN VOORHIS, W.C.; and KUHEN, K.L. Identification of inhibitors for putative malaria drug targets among novel antimalarial compounds. *Mol Biochem Parasitol*, 175(1):21-9, 2011.

CRUZ, L.R.; SPANGENBERG, T.; LACERDA, M.V.; and WELLS, T.N. Malaria in South America: a drug discovery perspective. *Malar J*, 12:168, 2013.

D'ALEXANDRI, F.L.; GOZZO, F.C.; EBERLIN, M.N.; and KATZIN, A.M. Electrospray ionization mass spectrometry analysis of polyisoprenoid alcohols via Li<sup>+</sup> cationization. *Anal Biochem*, 355(2):189-200, 2006.

D'ALEXANDRI, F.L.; KIMURA, E.A.; PERES, V.J.; and KATZIN, A.M. Protein dolichylation in *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett*, 580(27):6343-8, 2006.

DE FERREIRA-DA-CRUZ, M.; ADAMI, Y.L.; DA ESPINOLA-MENDES, E.; FIGUEIREDO, M.R.; and DANIEL-RIBEIRO, C.T. The intraperitoneal *Plasmodium berghei*-Pasteur infection of Swiss mice is not a system that is able

to detect the antiplasmodial activity in the *Pothomorphe* plant extracts that are used as antimalarials in Brazilian endemic areas. *Exp Parasitol*, 94(4):243-7, 2000.

DE MACEDO, C.S.; UHRIG, M.L.; KIMURA, E.A.; and KATZIN, A.M. Characterization of the isoprenoid chain of coenzyme Q in *Plasmodium falciparum*. *FEMS Microbiol Lett*, 207(1):13-20, 2002.

DESJARDINS, R.E.; CANFIELD, C.J.; HAYNES, J.D.; and CHULAY, J.D. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother*, 16(6):710-8, 1979.

DIAZ, G.; GONZALEZ, F.A.; and ROMERO, E. A semi-automatic method for quantification and classification of erythrocytes infected with malaria parasites in microscopic images. *J Biomed Inform*, 42(2):296-307, 2009.

DISCH, A.; HEMMERLIN, A.; BACH, T.J.; and ROHMER, M. Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side chain in tobacco BY-2 cells. *Biochem J*, 331 (Pt 2):615-21, 1998.

DOLABELA, M.F.; OLIVEIRA, S.G.; PERES, J.M.; NASCIMENTO, J.M.; POVOA, M.M.; and OLIVEIRA, A.B. In vitro antimalarial activity of six *Aspidosperma* species from the state of Minas Gerais (Brazil). *An Acad Bras Cienc*, 84(4):899-910, 2012.

DRUILHE, P.; BRASSEUR, P.; BLANC, C.; and MAKLER, M. Improved assessment of *plasmodium vivax* response to antimalarial drugs by a colorimetric double-site *plasmodium lactate dehydrogenase* antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(6):2112-6, 2007.

DUA, V.K.; VERMA, G.; SINGH, B.; RAJAN, A.; BAGAI, U.; AGARWAL, D.D.; GUPTA, N.C.; KUMAR, S.; and RASTOGI, A. Anti-malarial property of steroidal alkaloid conessine isolated from the bark of *Holarrhena antidysenterica*. *Malar J*, 12:194, 2013.

EGAN, T.J. Haemozoin formation. *Mol Biochem Parasitol*, 157(2):127-36, 2008.

EKLAND, E.H., and FIDOCK, D.A. In vitro evaluations of antimalarial drugs and their relevance to clinical outcomes. *Int J Parasitol*, 38(7):743-7, 2008.

FERREIRA-DA-CRUZ, M.F.; ADAMI, Y.L.; and ESPINOLA-MENDES, E.C. The intraperitoneal *Plasmodium berghei*-Pasteur infection of Swiss mice is not a system that is able to detect the antiplasmodial activity in the *Pothomorphe* plant extracts that are used as antimalarials in Brazilian endemic areas. 94. *Exp Parasitol*, 94:243-247, 2000.

FERREIRA, I.D.; LOPES, D.; MARTINELLI, A.; FERREIRA, C.; DO ROSARIO, V.E.; and CRAVO, P. In vitro assessment of artesunate, artemether and amodiaquine susceptibility and molecular analysis of putative resistance-

associated mutations of *Plasmodium falciparum* from Sao Tome and Principe. *Trop Med Int Health*, 12(3):353-62, 2007.

FERREIRA, M.S. Malária: Conceito, Etiologia e Ciclo Evolutivo. In: Veronesi, R., ed. *Tratado de infectologia*. São Paulo: Atheneu, 2005. pp. 1589-93.

FIDOCK, D.A.; ROSENTHAL, P.J.; CROFT, S.L.; BRUN, R.; and NWAKA, S. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nat Rev Drug Discov*, 3(6):509-20, 2004.

FLANNERY, E.L.; CHATTERJEE, A.K.; and WINZELER, E.A. Antimalarial drug discovery - approaches and progress towards new medicines. *Nat Rev Microbiol*, 11(12):849-62, 2013.

FRANÇA, T.C.C.; SANTOS, M.G.S.; and D., F.-V. Malária: Aspectos Históricos e Quimioterapia. *Química Nova*, 31(5):1271-1278, 2008.

FRANCO, L.L.; DE ALMEIDA, M.V.; LF, E.S.; VIEIRA, P.P.; POHLIT, A.M.; and VALLE, M.S. Synthesis and antimalarial activity of dihydroperoxides and tetraoxanes conjugated with bis(benzyl)acetone derivatives. *Chem Biol Drug Des*, 79(5):790-7, 2012.

FREDERICH, M.; TITS, M.; and ANGENOT, L. Potential antimalarial activity of indole alkaloids. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102(1):11-9, 2008.

GAMA, B.E.; LACERDA, M.V.G.; DANIEL-RIBEIRO, C.T.; and FERREIRA-DA-CRUZ, M.F. Chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites in Brazil: consequences on disease morbidity and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106(1):159-166, 2011.

GAMO, F.J.; SANZ, L.M.; VIDAL, J.; DE COZAR, C.; ALVAREZ, E.; LAVANDERA, J.L.; VANDERWALL, D.E.; GREEN, D.V.; KUMAR, V.; HASAN, S.; BROWN, J.R.; PEISHOFF, C.E.; CARDON, L.R.; and GARCIA-BUSTOS, J.F. Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature*, 465(7296):305-10, 2010.

GARAVITO, G.; BERTANI, S.; QUILIANO, M.; VALENTIN, A.; ALDANA, I.; and DEHARO, E. The in vivo antimalarial activity of methylene blue combined with pyrimethamine, chloroquine and quinine. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107(6):820-3, 2012.

GIRARD, M.P.; REED, Z.H.; FRIEDE, M.; and KIENY, M.P. A review of human vaccine research and development: malaria. *Vaccine*, 25(9):1567-80, 2007.

GOPALAN, R.C.; EMERCE, E.; WRIGHT, C.W.; KARAHALIL, B.; KARAKAYA, A.E.; and ANDERSON, D. Effects of the anti-malarial compound cryptolepine and its analogues in human lymphocytes and sperm in the Comet assay. *Toxicol Lett*, 207(3):322-5, 2011.

GUERIN, P.J.; OLLIARO, P.; NOSTEN, F.; DRUILHE, P.; LAXMINARAYAN, R.; BINKA, F.; KILAMA, W.L.; FORD, N.; and WHITE, N.J. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. *Lancet Infect Dis*, 2(9):564-73, 2002.

GUILLONEAU, C.; NAULT, A.; RAIMBAUD, E.; LEONCE, S.; KRAUS-BERTHIER, L.; PIERRE, A.; and GOLDSTEIN, S. Cytotoxic and antitumoral properties in a series of new, ring D modified, olivacine analogues. *Bioorg Med Chem*, 13(1):175-84, 2005.

GUO, Z.; VANGAPANDU, S.; SINDELAR, R.W.; WALKER, L.A.; and SINDELAR, R.D. Biologically active quassinoids and their chemistry: potential leads for drug design. *Curr Med Chem*, 12(2):173-90, 2005.

HENRIQUE, M.C. Estudo sobre a química e atividade biológica de *Aspidosperma desmanthum* e *Aspidosperma vargasii* (Apocynaceae). *Departamento de Química*. Manaus: Univeridade Federal do Amazonas, 2007.

HENRIQUE, M.C.; NUNOMURA, S.M.; and POHLIT, A.M. Alcalóides indólicos das cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. *Química Nova*, 33:2284-287, 2010.

HENRIQUE, M.C.; NUNOMURA, S.M.; and POHLIT, A.M. Alcalóides indólicos das cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. *Química Nova*, 33(2):284-287, 2010.

HOFER, M., H. GREGER, E K. MEREITER, *6a-acetoxypedunin*. *Acta Crystallographica*, 65:1942-1943, 2009.

HSU, E. The history of qing hao in the Chinese materia medica. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 100(6):505-8, 2006.

JAMBOU, R.; LEGRAND, E.; NIANG, M.; KHIM, N.; LIM, P.; VOLNEY, B.; EKALA, M.T.; BOUCHIER, C.; ESTERRE, P.; FANDEUR, T.; and MERCEREAU-PUJALON, O. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet*, 366(9501):1960-3, 2005.

JANA, S., and PALIWAL, J. Novel molecular targets for antimalarial chemotherapy. *Int J Antimicrob Agents*, 30(1):4-10, 2007.

JIMENEZ-DIAZ, M.B.; VIERA, S.; FERNANDEZ-ALVARO, E.; and ANGULO-BARTUREN, I. Animal models of efficacy to accelerate drug discovery in malaria. *Parasitology*, 141(1):93-103, 2013.

JITTANIYOM, C., et al., Andirobin from *x. Moluccensis*. *Acta Crystallographica*, 68:2550-2551, 2012.

JORDAO, F.M.; KIMURA, E.A.; and KATZIN, A.M. Isoprenoid biosynthesis in the erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106 Suppl 1:134-41, 2011.

JORDAO, F.M.; SAITO, A.Y.; MIGUEL, D.C.; DE JESUS PERES, V.; KIMURA, E.A.; and KATZIN, A.M. In vitro and in vivo antiplasmodial activities of risedronate and its interference with protein prenylation in Plasmodium falciparum. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(5):2026-31, 2011.

KAUR, K.; JAIN, M.; KAUR, T.; and JAIN, R. Antimalarials from nature. *Bioorg Med Chem*, 17(9):3229-56, 2009.

KIJJOA, A.; GIESBRECHT, A.M.; AKISUE, M.K.; GOTTLIEB, O.R.; and GOTTLIEB, H.E. 4-Nerolidylcatechol from Pothomorphe umbellata. *Planta Medica*, 39:85-87, 1980.

KIRBY, G.C.; PAINE, A.; WARHURST, D.C.; NOAMESE, B.; and PHILLIPSON, D. In vitro and in vivo antimalarial activity of cryptolepine, a plant derived indoloquinoline. *Phytotherapy Research*, 9:359-363, 1995.

KOTRBOVA, V.; MRAZOVA, B.; MOSEROVA, M.; MARTINEK, V.; HODEK, P.; HUDECEK, J.; FREI, E.; and STIBOROVA, M. Cytochrome b(5) shifts oxidation of the anticancer drug ellipticine by cytochromes P450 1A1 and 1A2 from its detoxication to activation, thereby modulating its pharmacological efficacy. *Biochem Pharmacol*, 82(6):669-80, 2011.

KRETTLI, A.U.; ADEBAYO, J.O.; and KRETTLI, L.G. Testing of natural products and synthetic molecules aiming at new antimalarials. *Curr Drug Targets*, 10(3):261-70, 2009.

KRETTLI, A.U.; ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDAO, M.G.; and FERRARI, W.M. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96(8):1033-42, 2001.

KRISHNA, S.; PULCINI, S.; MOORE, C.M.; TEO, B.H.; and STAINES, H.M. Pumped up: reflections on PfATP6 as the target for artemisinins. *Trends Pharmacol Sci*, 35(1):4-11, 2014.

KUMAR, S.; GUHA, M.; CHOUBEY, V.; MAITY, P.; and BANDYOPADHYAY, U. Antimalarial drugs inhibiting hemozoin (beta-hematin) formation: a mechanistic update. *Life Sci*, 80(9):813-28, 2007.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680-5, 1970.

LAMBROS, C., and VANDERBERG, J.P. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*, 65(3):418-20, 1979.

LAVRADO, J.; CABAL, G.G.; PRUDENCIO, M.; MOTA, M.M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P.J.; DIAZ, C.; GUEDES, R.C.; DOS SANTOS, D.J.; BICHENKOVA, E.; DOUGLAS, K.T.; MOREIRA, R.; and PAULO, A. Incorporation of basic side chains into cryptolepine scaffold: structure-

antimalarial activity relationships and mechanistic studies. *J Med Chem*, 54(3):734-50, 2011.

LAVRADO, J.; CABAL, G.G.; PRUDENCIO, M.; MOTA, M.M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P.J.; DIAZ, C.; GUEDES, R.C.; DOS SANTOS, D.J.; BICHENKOVA, E.; DOUGLAS, K.T.; MOREIRA, R.; and PAULO, A. Incorporation of Basic Side Chains into Cryptolepine Scaffold: Structure-Antimalarial Activity Relationships and Mechanistic Studies. *J Med Chem*, 2011.

LAVRADO, J.; PAULO, A.; GUT, J.; ROSENTHAL, P.J.; and MOREIRA, R. Cryptolepine analogues containing basic aminoalkyl side-chains at C-11: synthesis, antiplasmodial activity, and cytotoxicity. *Bioorg Med Chem Lett*, 18(4):1378-81, 2008.

LIMA, E.S.; PINTO, A.C.S.; NOGUEIRA, K.L.; ROCHA-E-SILVA, L.F.; ALMEIDA, P.D.O.; VASCONCELLOS, M.C.; CHAVES, F.C.; TADEI, W.P.; and POHLIT, A.M. Stability and antioxidant activity of semi-synthetic derivatives of 4-nerolidylcatechol. *Molecules*, 18:178-89, 2013.

LOMBARD, M.C.; N'DA, D.D.; TRAN VAN BA, C.; WEIN, S.; NORMAN, J.; WIESNER, L.; and VIAL, H. Potent in vivo anti-malarial activity and representative snapshot pharmacokinetic evaluation of artemisinin-quinoline hybrids. *Malar J*, 12:71, 2013.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. SP: Nova Odessa, 2002.

LYNEN, F. Biosynthetic pathways from acetate to natural products. *Pure Appl Chem*, 14(1):137-67, 1967.

MACKINNON, M.J. Drug resistance models for malaria. *Acta Trop*, 94(3):207-17, 2005.

MARKELL, E.K.; JOHN, D.T.; and KROTOSKI, W.A. *Parasitologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

MARQUES, M.M.; COSTA, M.R.; SANTANA FILHO, F.S.; VIEIRA, J.L.; NASCIMENTO, M.T.; BRASIL, L.W.; NOGUEIRA, F.; SILVEIRA, H.; REYES-LECCA, R.C.; MONTEIRO, W.M.; LACERDA, M.V.; and ALECRIM, M.G. Plasmodium vivax Chloroquine Resistance and Anemia in the Western Brazilian Amazon. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(1):342-7, 2013.

MEISCH, R.A. Oral drug self-administration: an overview of laboratory animal studies. *Alcohol*, 24(2):117-28, 2001.

MENARD, R.; HEUSSLER, V.; YUDA, M.; and NUSSENZWEIG, V. Plasmodium pre-erythrocytic stages: what's new? *Trends Parasitol*, 24(12):564-9, 2008.

MESSORI, L.; PICCIOLI, F.; EITLER, B.; BERGONZI, M.C.; BILIA, A.R.; and VINCIERI, F.F. Spectrophotometric and ESI-MS/HPLC studies reveal a common mechanism for the reaction of various artemisinin analogues with hemin. *Bioorg Med Chem Lett*, 13(22):4055-7, 2003.

MILLER, L.H.; ACKERMAN, H.C.; SU, X.Z.; and WELLEMS, T.E. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med*, 19(2):156-67, 2013.

MILLKEN, W. *Plants for Malaria, Plants for Fever: Medicinal Species in Latin America, A Bibliographic Survey*. Royal Botanic Gardens. Richmond, VA, USA, 1997.

MIRANDA JUNIOR, R.N., et al., *Antiplasmodial activity of the andiroba (Carapa guianensis Aubl., Meliaceae) oil and its limonoid-rich fraction*. *J Ethnopharmacol*, 142(3): 679-83, 2012.

MONTOIA, A. Semi-Síntese de derivados da elipticina e atividade antimalárica de isolados e infusão de *Aspidosperma vargasii*. *Programa de Pós-graduação em Química*. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2013.

MOODY, D.L.; DYBA, M.; KOSAKOWSKA-CHOLODY, T.; TARASOVA, N.I.; and MICHEJDA, C.J. Synthesis and biological activity of 5-aza-ellipticine derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, 17(8):2380-4, 2007.

MOTA, M.L.; LOBO, L.T.; COSTA, J.M.; COSTA, L.S.; ROCHA, H.A.; ROCHA E SILVA, L.F.; POHLIT, A.M.; and NETO, V.F. In vitro and in vivo antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in northeastern Brazil. *Planta Med*, 78(7):658-64, 2012.

MOTA, M.L.; LOBO, L.T.; GALBERTO DA COSTA, J.M.; COSTA, L.S.; ROCHA, H.A.; ROCHA, E.S.L.F.; POHLIT, A.M.; and DE ANDRADE NETO, V.F. In vitro and in vivo antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in northeastern Brazil. *Planta Med*, 78(7):658-64, 2012.

MUELLER, M.S.; KARHAGOMBA, I.B.; HIRT, H.M.; and WEMAKOR, E. The potential of *Artemisia annua* L. as a locally produced remedy for malaria in the tropics: agricultural, chemical and clinical aspects. *J Ethnopharmacol*, 73(3):487-93, 2000.

MUELLER, M.S.; RUNYAMBO, N.; WAGNER, I.; BORRMANN, S.; DIETZ, K.; and HEIDE, L. Randomized controlled trial of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (Annual Wormwood) in the treatment of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 98(5):318-21, 2004.

NCOKAZI, K.K., and EGAN, T.J. A colorimetric high-throughput beta-hematin inhibition screening assay for use in the search for antimalarial compound. *Anal Biochem* (338):306-319, 2005.

NCOKAZI, K.K., and EGAN, T.J. A colorimetric high-throughput beta-hematin inhibition screening assay for use in the search for antimalarial compounds. *Anal Biochem*, 338(2):306-19, 2005.

NEWMAN, D.J., and CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*, 75(3):311-35, 2012.

NOGUEIRA, F., and ROSARIO, V.E. Métodos para avaliação da atividade antimalárica nas diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium*. *Rev Pan-Amaz Saude*, 1(3):109-124, 2010.

NOGUEIRA, F., and ROSÁRIO, V.E. Métodos para avaliação da atividade antimalárica nas diferentes fases do ciclo de vida do Plasmodium. *Rev Pan-Amaz Saude*, 1(3):109-124, 2010.

NOWICKA, B., and KRUK, J. Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *Biochim Biophys Acta*, 1797(9):1587-605, 2010.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M.V.; BRASIL, P.; LADISLAU, J.L.; TAUIL, P.L.; and DANIEL-RIBEIRO, C.T. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*, 9:115, 2010.

OLSZEWSKI, K.L.; LLINÁS, M. Central carbon metabolism of Plasmodium parasites. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 175 :95-103, 2011.

PASSEMAR, C.; SALERY, M.; SOH, P.N.; LINAS, M.D.; AHOND, A.; POUPAT, C.; and BENOIT-VICAL, F. Indole and aminoimidazole moieties appear as key structural units in antiplasmodial molecules. *Phytomedicine*, 18(13):1118-25, 2011.

PETERS, W. Drug resistance in Plasmodium berghei Vincke and Lips, 1948. 3. Multiple drug resistance. *Exp Parasitol*, 17(1):97-102, 1965.

PETERS, W. Drug resistance in Plasmodium berghei Vincke and Lips, 1948. I. Chloroquine resistance. *Exp Parasitol*, 17(1):80-9, 1965.

PEREIRA, T.B. Limonóides antimaláricos e nematicida a partir dos resíduos do processo industrial de produção do óleo da Andiroba (*Carapa guianensis*. Aubl.- Meliaceae). *Departamento de Química*. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2013.

PINTO, A.C. DESENVOLVIMENTO DE SUBSTÂNCIAS SEMI-SINTÉTICAS E BIOATIVAS A PARTIR DE 4-NEROLIDILCATECOL E DILAPIOL. *Programa de Pós-graduação em biotecnologia*. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2008. pp. 296.

PINTO, A.C.; CHAVES, F.C.; DOS SANTOS, P.A.; NUNEZ, C.V.; TADEI, W.P.; and POHLIT, A.M. Piper peltatum: biomass and 4-nerolidylcatechol production. *Planta Med*, 76(13):1473-6, 2010.

PINTO, A.C.; SILVA, L.F.; CAVALCANTI, B.C.; MELO, M.R.; CHAVES, F.C.; LOTUFO, L.V.; DE MORAES, M.O.; DE ANDRADE-NETO, V.F.; TADEI, W.P.; PESSOA, C.O.; VIEIRA, P.P.; and POHLIT, A.M. New antimalarial and cytotoxic 4-nerolidylcatechol derivatives. *Eur J Med Chem*, 44(6):2731-5, 2009.

PINTO, A.C.S.; MELO, M.R.S.; ANDRADE NETO, V.F.; CHAVES, F.C.M.; VIEIRA, P.P.R.; and POHLIT, A.M. Derivatives of 4-nerolidylcatechol, Pharmaceutical Compositions Comprising Them and Process for Producing the Same. In: WO/2009/082795, ed, 2009.

PINTO, A.C.S.; MELO, M.R.S.; ANDRADE NETO, V.F.; CHAVES, F.C.M.; VIEIRA, P.P.R.; POHLIT, A.M. Derivatives of 4-nerolidylcatechol, Pharmaceutical Compositions Comprising Them and Process for Producing the Same. O/2009/082795, 9 July 2009.

POHLIT, A.M.; LIMA, R.B.; FRAUSIN, G.; SILVA, L.F.; LOPES, S.C.; MORAES, C.B.; CRAVO, P.; LACERDA, M.V.; SIQUEIRA, A.M.; FREITAS-JUNIOR, L.H.; and COSTA, F.T. Amazonian plant natural products: perspectives for discovery of new antimalarial drug leads. *Molecules*, 18(8):9219-40, 2013.

POHLIT, A.M.; MUSTAFA-DOS-SANTOS, E.V.; SILVA, T.C.M.; MORAIS, S.K.R.; NUNOMURA, S.M.; and STRUWE, L. A rare secoiridoid monoterpene and a xanthone from *Tachia grandiflora* Maguire & Weaver. *Biochemical Systematics and Ecology*, 44:267-269, 2012.

POHLIT, A.M.; ROCHA E SILVA, L.F.; HENRIQUE, M.C.; MONTOIA, A.; AMORIM, R.C.; NUNOMURA, S.M.; and ANDRADE-NETO, V.F. Antimalarial activity of ellipticine. *Phytomedicine*, 19(11):1049, 2012.

POHLIT, A.M.; ROCHA, E.S.L.F.; HENRIQUE, M.C.; MONTOIA, A.; AMORIM, R.C.; NUNOMURA, S.M.; and ANDRADE-NETO, V.F. Antimalarial activity of ellipticine. *Phytomedicine*, 19(11):1049, 2012.

RALPH, S.A.; VAN DOOREN, G.G.; WALLER, R.F.; CRAWFORD, M.J.; FRAUNHOLZ, M.J.; FOTH, B.J.; TONKIN, C.J.; ROOS, D.S.; and MCFADDEN, G.I. Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nat Rev Microbiol*, 2(3):203-16, 2004.

RAMALHETE, C.; LOPES, D.; MOLNAR, J.; MULHOVO, S.; ROSARIO, V.E.; and FERREIRA, M.J. Karavilagenin C derivatives as antimalarials. *Bioorg Med Chem*, 19(1):330-8, 2011.

REZENDE, K.R., and BARROS, S.B.M. Quantification of 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) in rat plasma samples by HPLC-UV. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40(3):373-380, 2004.

REZENDE, L.C.; FUMAGALLI, F.; BORTOLIN, M.S.; DE OLIVEIRA, M.G.; DE PAULA, M.H.; DE ANDRADE-NETO, V.F.; and EMERY FDA, S. In vivo antimalarial activity of novel 2-hydroxy-3-anilino-1,4-naphthoquinones obtained by epoxide ring-opening reaction. *Bioorg Med Chem Lett*, 23(16):4583-6, 2013.

RIDDER, S.; VAN DER KOOY, F.; and VERPOORTE, R. Artemisia annua as a self-reliant treatment for malaria in developing countries. *J Ethnopharmacol*, 120(3):302-14, 2008.

RIECKMANN, K.H.; CAMPBELL, G.H.; SAX, L.J.; and MREMA, J.E. Drug sensitivity of plasmodium falciparum. An in-vitro microtechnique. *Lancet*, 1(8054):22-3, 1978.

RIECKMANN, K.H.; MCNAMARA, J.V.; FRISCHER, H.; STOCKERT, T.A.; CARSON, P.E.; and POWELL, R.D. Effects of chloroquine, quinine, and cycloguanil upon the maturation of asexual erythrocytic forms of two strains of Plasmodium falciparum in vitro. *Am J Trop Med Hyg*, 17(5):661-71, 1968.

ROCHA-E-SILVA, L.F.; LIMA, E.S.; DE VASCONCELLOS, M.C.; ARANHA, E.S.; COSTA, D.S.; MUSTAFA, E.V.; DE MORAIS, S.K.; ALECRIM, M.; NUNOMURA, S.M.; STRUWE, L.; DE ANDRADE-NETO, V.F.; and POHLIT, A.M. In vitro and in vivo antimalarial activity and cytotoxicity of extracts, fractions and a substance isolated from the Amazonian plant Tachia grandiflora (Gentianaceae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108(4):501-7, 2013.

ROCHA-E-SILVA, L.F.; MAGALHAES, P.M.; COSTA, M.R.; ALECRIM, M.; CHAVES, F.C.; HIDALGO ADE, F.; POHLIT, A.M.; and VIEIRA, P.P. In vitro susceptibility of Plasmodium falciparum Welch field isolates to infusions prepared from Artemisia annua L. cultivated in the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107(7):859-66, 2012.

ROCHA-E-SILVA, L.F.; MONTOIA, A.; AMORIM, R.C.; MELO, M.R.; HENRIQUE, M.C.; NUNOMURA, S.M.; COSTA, M.R.; ANDRADE NETO, V.F.; COSTA, D.S.; DANTAS, G.; LAVRADO, J.; MOREIRA, R.; PAULO, A.; PINTO, A.C.; TADEI, W.P.; ZACARDI, R.S.; EBERLIN, M.N.; and POHLIT, A.M. Comparative in vitro and in vivo antimalarial activity of the indole alkaloids ellipticine, olivacine, cryptolepine and a synthetic cryptolepine analog. *Phytomedicine*, 20(1):71-6, 2012.

ROCHA-E-SILVA, L.F.; MONTOIA, A.; AMORIM, R.C.N.; MELO, M.R.; HENRIQUE, M.C.; NUNOMURA, S.M.; COSTA, M.R.F.; ANDRADE-NETO, V.F.; SIQUEIRA, D.C.; DANTAS, G.; LAVRADO, J.; MOREIRA, R.; PAULO, A.; PINTO, A.C.; TADEI, W.P.; ZACARDI, R.S.; EBERLIN, M.; and POHLIT, A.M. Comparative *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity of the indole alkaloids ellipticine, olivacine, cryptolepine and a synthetic cryptolepine analog. *Phytomedicine*, 20:71-76, 2012.

ROCHA-E-SILVA, L.F.; SILVA PINTO, A.C.; POHLIT, A.M.; QUIGNARD, E.L.; VIEIRA, P.P.; TADEI, W.P.; CHAVES, F.C.; SAMONEK, J.F.; LIMA, C.A.; COSTA, M.R.; ALECRIM, M.G.; and ANDRADE-NETO, V.F. In vivo and in vitro antimalarial activity of 4-nerolidylcatechol. *Phytother Res*, 25(8):1181-8, 2011.

ROCHA E SILVA, L.F.; LIMA, E.S.; DE VASCONCELLOS, M.C.; ARANHA, E.S.; COSTA, D.S.; MUSTAFA, E.V.; DE MORAIS, S.K.; ALECRIM, M.;

NUNOMURA, S.M.; STRUWE, L.; DE ANDRADE-NETO, V.F.; and POHLIT, A.M. In vitro and in vivo antimalarial activity and cytotoxicity of extracts, fractions and a substance isolated from the Amazonian plant *Tachia grandiflora* (Gentianaceae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108(4):501-7, 2013.

RODRIGUES GOULART, H.; KIMURA, E.A.; PERES, V.J.; COUTO, A.S.; AQUINO DUARTE, F.A.; and KATZIN, A.M. Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(7):2502-9, 2004.

ROHMER, M. Isoprenoid biosynthesis via the mevalonate-independent route, a novel target for antibacterial drugs? *Prog Drug Res*, 50:135-54, 1998.

ROHMER, M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep*, 16(5):565-74, 1999.

RUSSELL, B.; CHALFEIN, F.; PRASETYORINI, B.; KENANGALEM, E.; PIERA, K.; SUWANARUSK, R.; BROCKMAN, A.; PRAYOGA, P.; SUGIARTO, P.; CHENG, Q.; TJITRA, E.; ANSTEY, N.M.; and PRICE, R.N. Determinants of in vitro drug susceptibility testing of *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(3):1040-5, 2008.

SALA-NETO, F.; DA-SILVA, J.S.; PIRES, R.O.; NASCIMENTO, N.P.; BRENNER, C.; BOUBLI, J.P.; and TOSTA, C.E. Uma nova Metodologia para a avaliação da atividade Antimalárica de Produtos Vegetais: Aplicação ao Estudo de 83 Espécies da Flora Brasileira. *Anais do 2º Simpósio de Malária. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 25(II):92, 1992.

SANCHEZ, B.A.; VAROTTI, F.P.; RODRIGUES, F.G.; and CARVALHO, L.H. Validation of a *Plasmodium falciparum* parasite transformed with green fluorescent protein for antimalarial drug screening. *J Microbiol Methods*, 69(3):518-22, 2007.

SANTANA FILHO, F.S.; ARCANJO, A.R.; CHEHUAN, Y.M.; COSTA, M.R.; MARTINEZ-ESPINOSA, F.E.; VIEIRA, J.L.; BARBOSA, M.; ALECRIM, W.D.; and ALECRIM, M. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*, 13(7):1125-6, 2007.

SANTOS-TORRES, Z.E. Metabólitos secundários, com potencial farmacológico, de *Aspidosperma ulei*. *Química*. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2012.

SANTOS-TORRES, Z.E.; SILVEIRA, E.R.; ROCHA E SILVA, L.F.; LIMA, E.S.; DE VASCONCELLOS, M.C.; DE ANDRADE UCHOA, D.E.; FILHO, R.B.; and POHLIT, A.M. Chemical composition of *Aspidosperma ulei* Markgr. and antiplasmodial activity of selected indole alkaloids. *Molecules*, 18(6):6281-97, 2013.

SCHMIDT, T.J.; KHALID, S.A.; ROMANHA, A.J.; ALVES, T.M.; BIAVATTI, M.W.; BRUN, R.; DA COSTA, F.B.; DE CASTRO, S.L.; FERREIRA, V.F.; DE LACERDA, M.V.; LAGO, J.H.; LEON, L.L.; LOPES, N.P.; DAS NEVES AMORIM, R.C.; NIEHUES, M.; OGUNGBE, I.V.; POHLIT, A.M.; SCOTTI, M.T.; SETZER, W.N.; DE, N.C.S.M.; STEINDEL, M.; and TEMPONE, A.G. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part I. *Curr Med Chem*, 19(14):2128-75, 2012.

SCHMIDT, T.J.; KHALID, S.A.; ROMANHA, A.J.; ALVES, T.M.; BIAVATTI, M.W.; BRUN, R.; DA COSTA, F.B.; DE CASTRO, S.L.; FERREIRA, V.F.; DE LACERDA, M.V.; LAGO, J.H.; LEON, L.L.; LOPES, N.P.; DAS NEVES AMORIM, R.C.; NIEHUES, M.; OGUNGBE, I.V.; POHLIT, A.M.; SCOTTI, M.T.; SETZER, W.N.; DE, N.C.S.M.; STEINDEL, M.; and TEMPONE, A.G. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part II. *Curr Med Chem*, 19(14):2176-228, 2012.

SILVA, E.C.; CAVALCANTI, B.C.; AMORIM, R.C.; LUCENA, J.F.; QUADROS, D.S.; TADEI, W.P.; MONTENEGRO, R.C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; NUNOMURA, R.C.; NUNOMURA, S.M.; MELO, M.R.; ANDRADE-NETO, V.F.; SILVA, L.F.; VIEIRA, P.P.; and POHLIT, A.M. Biological activity of neosergeolide and isobrucein B (and two semi-synthetic derivatives) isolated from the Amazonian medicinal plant *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(1):48-56, 2009.

SILVA, J.R. Resistência do *Plasmodium falciparum* à ação da cloroquina. *O Hospital*, 60:43-58, 1961.

SILVA, S.G. e R.C.S. NUNOMURA, *Limonoides isolados dos frutos de Carapa guianensis Aublet (Meliaceae)*. *Química Nova*. 35(10): S1-S18, , 2012.

SILVA, J.R.; RAMOS ADE, S.; MACHADO, M.; DE MOURA, D.F.; NETO, Z.; CANTO-CAVALHEIRO, M.M.; FIGUEIREDO, P.; DO ROSARIO, V.E.; AMARAL, A.C.; and LOPES, D. A review of antimalarial plants used in traditional medicine in communities in Portuguese-speaking countries: Brazil, Mozambique, Cape Verde, Guinea-Bissau, Sao Tome and Principe and Angola. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106 Suppl 1:142-58, 2011.

SILVA LIMA, E.; SILVA PINTO, A.C.; NOGUEIRA, K.L.; ROCHA E SILVA, L.F.; OLIVEIRA DE ALMEIDA, P.D.; CARVALHO DE VASCONCELLOS, M.; CHAVES, F.C.; TADEI, W.P.; and POHLIT, A.M. Stability and antioxidant activity of semi-synthetic derivatives of 4-nerolidylcatechol. *Molecules*, 18(1):178-89, 2013.

SPURGEON, S., AND PORTER, J. Biosynthesis of isoprenoid compounds (Porter, J., and Spurgeon, S., eds.). *John Wiley and sons, New York*:1-46, 1981.

SUSSMANN, R.A.; ANGELI, C.B.; PERES, V.J.; KIMURA, E.A.; and KATZIN, A.M. Intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* biosynthesize vitamin E. *FEBS Lett*, 585(24):3985-91, 2011.

SUTHERLAND, C.J.; TANOMSING, N.; et al. Two Nonrecombining Sympatric Forms of the Human Malaria Parasite *Plasmodium ovale* Occur Globally. *Journal of Infectious Diseases*, 201: 1544-1550. 2010

TA, T.H.; HISAM, H.; LANZA, M.; JIRAM, A. I.; ISMAIL, N.P.; RUBIO, J.M. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi* *Malaria Journal* 68:1-7, 2014

TADEI, W.P., and DUTARY THATCHER, B. Malaria vectors in the Brazilian amazon: Anopheles of the subgenus Nyssorhynchus. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 42(2):87-94, 2000.

TANAKA, Y.S.A., INOUE, T.; YAMADA, T.; KIKUCHI; KAJIMOTO, T.; MURAOKA, O.; SATO, A.; WATAYA, Y.; KIM, H.; TANAKA, R.; Andiroles H-P from the flower of andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae). *Tetrahedron*, 68: 3669-3677, 2012.

TASANOR, O.; NOEDL, H.; NA-BANGCHANG, K.; CONGPUONG, K.; SIRICHAISINTHOP, J.; and WERNSDORFER, W.H. An in vitro system for assessing the sensitivity of *Plasmodium vivax* to chloroquine. *Acta Trop*, 83(1):49-61, 2002.

THOME, R.; LOPES, S.C.; COSTA, F.T.; and VERINAUD, L. Chloroquine: modes of action of an undervalued drug. *Immunol Lett*, 153(1-2):50-7, 2013.

TONHOSOLO, R.; D'ALEXANDRI, F.L.; DE ROSSO, V.V.; GAZARINI, M.L.; MATSUMURA, M.Y.; PERES, V.J.; MERINO, E.F.; CARLTON, J.M.; WUNDERLICH, G.; MERCADANTE, A.Z.; KIMURA, E.A.; and KATZIN, A.M. Carotenoid biosynthesis in intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, 284(15):9974-85, 2009.

TONHOSOLO, R.; GABRIEL, H.B.; MATSUMURA, M.Y.; CABRAL, F.J.; YAMAMOTO, M.M.; D'ALEXANDRI, F.L.; SUSSMANN, R.A.; BELMONTE, R.; PERES, V.J.; CRICK, D.C.; WUNDERLICH, G.; KIMURA, E.A.; and KATZIN, A.M. Intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* biosynthesize menaquinone. *FEBS Lett*, 584(23):4761-8, 2010.

TORRES, Z.E.S.; SILVEIRA, E.R.; ROCHA E SILVA, L.F.; LIMA, E.S.; DE VASCONCELLOS, M.C.; DE ANDRADE UCHOA, D.E.; FILHO, R.B.; and POHLIT, A.M. Chemical composition of *Aspidosperma ulei* Markgr. and antiplasmodial activity of selected indole alkaloids. *Molecules*, 18(6):6281-97, 2013.

TRAGER, W., and JENSEN, J.B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193(4254):673-5, 1976.

TRAPE, J.F.; PISON, G.; SPIEGEL, A.; ENEL, C.; and ROGIER, C. Combating malaria in Africa. *Trends Parasitol*, 18(5):224-30, 2002.

UDOMSANGPETCH, R.; SOMSRI, S.; PANICHAKUL, T.; CHOTIVANICH, K.; SIRICHAISINTHOP, J.; YANG, Z.; CUI, L.; and SATTABONGKOT, J. Short-term in vitro culture of field isolates of *Plasmodium vivax* using umbilical cord blood. *Parasitol Int*, 56(1):65-9, 2007.

VALE, N.; MOREIRA, R.; and GOMES, P. Quimioterapia da Malária um século no desenvolvimento de antimaláricos. *Química Nova*, 99:57-69, 2005.

VAN DER MEER, J.Y., and HIRSCH, A.K. The isoprenoid-precursor dependence of *Plasmodium* spp. *Nat Prod Rep*, 29(7):721-8, 2012.

WEATHERALL, D.J.; MILLER, L.H.; BARUCH, D.I.; MARSH, K.; DOUMBO, O.K.; CASALS-PASCUAL, C.; and ROBERTS, D.J. Malaria and the red cell. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:35-57, 2002.

WELLS, T.N. Natural products as starting points for future anti-malarial therapies: going back to our roots? *Malar J*, 10 Suppl 1:S3, 2011.

WHO - World Health Organization 2007. Field application of in vitro assays for the sensitivity of human malaria parasites to antimalarial drugs. Library Cataloguing-in-Publication Data.

WHO - World Health Organization. World Malaria Report 2011. Available from: [who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2011/en/index.html](http://who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/index.html).

WHO - World Health Organization. World Malaria Report 2013. Available from: [who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2013/en/index.html](http://who.int/malaria/world_malaria_report_2013/en/index.html).

WHO - World Health Organization. World Malaria Report 2010. Available from: [who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2010/en/index.html](http://who.int/malaria/world_malaria_report_2010/en/index.html).

WRIGHT, C.W. Traditional antimalarials and the development of novel antimalarial drugs. *J Ethnopharmacol*, 100(1-2):67-71, 2005.

WRIGHT, C.W.; ADDAE-KYEREME, J.; BREEN, A.G.; BROWN, J.E.; COX, M.F.; CROFT, S.L.; GOKCEK, Y.; KENDRICK, H.; PHILLIPS, R.M.; and POLLET, P.L. Synthesis and evaluation of cryptolepine analogues for their potential as new antimalarial agents. *J Med Chem*, 44(19):3187-94, 2001.

YOUNG, M.D., and BURGESS, R.W. Pyrimethamine resistance in *Plasmodium vivax* malaria. *Bull World Health Organ*, 20(1):27-36, 1959.

# Anexos

---

**Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido**



**Anexo 3 – Parecer consubstanciado sobre protocolo de pesquisas no uso de animais**